

Université de Sherbrooke

**Rôles et régulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines dans la
progression du cancer colorectal**

Par

Salah Boudjadi

Programmes de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de Docteur en sciences (PhD) en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada

Juin 2016

Membres du jury d'évaluation

Professeur Jean-François Beaulieu, biologie cellulaire

Professeure Julie C Carrier, département de médecine

Professeur Pierre H Vachon, biologie cellulaire

Professeur Benoit Paquette, Département de médecine nucléaire et de radiobiologie

Professeur Serge Jothy, biologie cellulaire et moléculaire, Université de Toronto

©Salah Boudjadi, 2016

Plus j'en apprends, plus je me rends compte de mon ignorance

Ash-Shâfi'î

Publications

Cette thèse comporte plusieurs résultats de recherche qui ont été publiés au cours de la formation doctorale dans des revues scientifiques avec comité de révision par les pairs.

Boudjadi S, Carrier JC, Groulx JF, Beaulieu JF. ***Integrin $\alpha 161$ expression is controlled by c-MYC in colorectal cancers.*** Oncogene (2015), 1–8. PMID: 26096932.

Boudjadi S and Beaulieu JF. ***ITGA1 (integrin, alpha 1);*** Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. October 2014.

Boudjadi S, Carrier JC, Beaulieu JF. ***Alpha1 integrin subunit is up regulated in colorectal cancer.*** Biomarker Research 2013, 1:16. PMID: 24252313.

Boudjadi S and Beaulieu JF. ***MYC and integrins interplay in colorectal cancer*** (Editorial). Oncoscience-2016.

Partie des sources de financement pour la formation doctorale

- Bourse du Centre d'Excellence de l'Université de Sherbrooke
- Bourse du Centre de recherche sur la biologie des épithéliums de l'Université de Sherbrooke

Rôles et régulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines dans la progression du cancer colorectal

Par Salah Boudjadi

Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

Dans le monde actuel, il demeure encore que le cancer colorectal soit une des premières causes de mortalité par cancer. Le développement et la progression de ce cancer fait intervenir des événements complexes comme les mutations oncogéniques mais aussi la surexpression de différents récepteurs membranaires dont les intégrines. Dans l'intestin grêle, l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ est exprimée uniquement par les cellules prolifératives de la crypte. Ce profil supporte le rôle rapporté pour cette intégrine dans le recrutement de la cavéoline-1 et l'activation en aval, via Shc, de la voie proliférative Ras/ERK dans les fibroblastes. L'expression de la sous-unité $\alpha 1$ n'a pas été décrite dans le tissu colique normal et tumoral. Chez la souris, l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ soutient la motilité des cellules tumorales mammaires et, de concert avec le facteur oncogénique Kras, elle potentialise la croissance et l'invasion tumorales. Ces rôles ne sont pas connus dans le cancer colorectal. L'objectif dans cette étude est d'analyser l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans le cancer colorectal, de définir les facteurs de régulation de son expression et d'identifier les rôles de l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ dans la progression du cancer colorectal. Mes expériences de recherche ont permis de montrer que la sous-unité $\alpha 1$ est présente dans 65% des adénocarcinomes colorectaux et que son expression est observée non seulement dans les cellules épithéliales mais aussi dans les cellules du microenvironnement de la tumeur. Mes résultats ont contribué à l'identification de la sous-unité $\alpha 1$ comme une nouvelle cible directe de l'oncogène MYC dans le cancer colorectal. J'ai démontré que MYC se lie directement au promoteur du gène *ITGA1* au niveau de deux éléments de réponse spécifiques. Ce contrôle s'est reflété par une corrélation significative entre l'expression des deux protéines MYC et $\alpha 1$ dans 72% des adénocarcinomes étudiés. J'ai pu également montrer pour la première fois que l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ est importante pour la prolifération des cellules tumorales colorectales ainsi que pour leur migration et leur survie. De plus, en utilisant des modèles de xénogreffes, j'ai observé que cette intégrine est importante pour la croissance des tumeurs colorectales, et son absence induit également une importante nécrose tumorale. Mes découvertes apportent de nouvelles connaissances dans la compréhension de l'implication de l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ dans la carcinogenèse colorectale. Cette intégrine pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer colorectal.

Mots clés : intégrine $\alpha 1 \beta 1$, MYC, transcription, cancer colorectal, immunohistochimie, prolifération, migration.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
1. Introduction.....	1
1.1. Le côlon dans le tractus gastro-intestinal	1
1.2. La muqueuse du côlon.....	2
1.3. Le cancer colorectal	6
1.3.1. Épidémiologie	6
1.3.2. Développement et caractéristiques du cancer colorectal.....	6
1.3.3. Histologie du cancer colorectal.....	8
1.3.4. Classification anatomoclinique (TNM et regroupement en stades)	10
1.4. Le facteur oncogénique MYC	12
1.5. Les intégrines	16
1.6. Les intégrines dans l'intestin normal et dans le cancer colorectal	20
1.7. L'intégrine $\alpha 1\beta 1$	22
1.8. La migration cellulaire	25
2. Problématique, hypothèse et objectifs.....	27
3. Matériels et méthodes	29
3.1. Patients, tissus et TMA.....	29
3.2. Immunohistochimie et définition des scores d'expression	30
3.3. Immunofluorescence	33
3.4. Culture cellulaire.....	33
3.5. Extraction des ARNs	34
3.6. Transcription inverse (synthèse de l'ADN complémentaire)	35
3.7. Réaction par polymérisation en chaine quantitative en temps réel (qPCR) ...	35
3.8. Réaction par polymérisation en chaine standard (PCR)	37
3.9. Extraction des protéines.....	37
3.10. Dosage des protéines.....	38
3.11. Immunobuvardage	38
3.12. Transfections transitoires et essais luciférase.....	40
3.13. Analyse bioinformatique du promoteur du gène <i>ITGA1</i>	41
3.14. Mutagenèse dirigée.....	41

3.15. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	43
3.16. Génération des virus sh-MYC, sh- α 1 et sh-Ctrl (contrôle)	46
3.17. Infection des cellules tumorales coliques	47
3.18. Courbe de croissance	47
3.19. Incorporation du BrdU	48
3.20. Test de migration	49
3.21. Test d'anoïkose	49
3.22. Essais caspases	51
3.23. Xénogreffes	52
4. Résultats	53
4.1. Profil d'expression de la sous-unité α 1 dans les muqueuses intestinale et colique	53
4.2. Localisation subcellulaire de la sous-unité α 1 dans la muqueuse colique et l'adénocarcinome du côlon	53
4.3. Expression de la sous-unité α 1 dans le cancer colorectal.....	55
4.4. La méthylation de l'ADN n'est pas le mécanisme de régulation de l'expression du gène <i>ITGA1</i> dans le CCR	64
4.5. Analyse du promoteur du gène <i>ITGA1</i>	66
4.6. Contrôle de l'expression du gène <i>ITGA1</i> par le facteur de transcription MYC dans le cancer colorectal	71
4.7. Expression de MYC et la sous-unité α 1 dans le cancer colorectal	76
4.8. Implication de l'intégrine α 1 β 1 dans la progression du cancer colorectal	80
5. Discussion	89
5.1. Expression de la sous-unité α 1 dans le cancer colorectal	89
5.2. La méthylation de l'ADN n'est pas impliquée dans la régulation de l'expression du gène <i>ITGA1</i> dans le cancer colorectal	92
5.3. Modulation de l'expression du gène <i>ITGA1</i> par le facteur de transcription MYC dans les cellules cancéreuses colorectales	93
5.4. Corrélation entre l'expression de MYC et de la sous-unité α 1 dans le cancer colorectal	97
5.5. Implication de l'intégrine α 1 β 1 dans la prolifération, la survie et la migration des cellules cancéreuses colorectales	99
6. Conclusion	105
7. Perspectives.....	107
8. Remerciements	108
9. Liste des références.....	109

LISTE DES FIGURES

Figure 1. La muqueuse colique normale.....	5
Figure 2. Le réseau MYC/MAX/MAD et leur activité transcriptionnelle	13
Figure 3. Régulation de MYC et sa relation avec les voies de signalisation liées aux intégrines	15
Figure 4. La super famille des intégrines	17
Figure 5. Activation et signalisation bidirectionnelle des intégrines	19
Figure 6. Implication de la sous-unité $\alpha 1$ dans la signalisation induite par l'intégrine $\alpha 1\beta 1$	24
Figure 7. Représentation schématique de l'implication des intégrines dans la migration cellulaire	26
Figure 8. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans la muqueuse de l'intestin grêle, du côlon et dans les cellules Caco 2/15	54
Figure 9. Immunolocalisation de la sous-unité $\alpha 1$ dans l'adénocarcinome du côlon	55
Figure 10. Expression du messenger de la sous-unité $\alpha 1$ dans le cancer colorectal	59
Figure 11. Validation de l'anticorps anti- $\alpha 1$ en immunohistochimie	60
Figure 12. Images représentatives de l'expression immunohistochimique de la sous- unité $\alpha 1$ des intégrines dans le CCR.....	61
Figure 13. Quantification relative de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ entre les composantes épithéliale et stromale dans le tissu tumoral par rapport au tissu de la marge de résection.....	63
Figure 14. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans différentes lignées tumorales colorectales	65
Figure 15. Régulation transcriptionnelle du promoteur du gène <i>ITGA1</i>	68
Figure 16. Représentation schématique des éléments de réponse pour MYC sur le promoteur du gène <i>ITGA1</i>	69
Figure 17. MYC contrôle le promoteur du gène <i>ITGA1</i> au niveau de deux éléments de réponse	70
Figure 18. L'inhibition de MYC entraine une baisse de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les cellules cancéreuses colorectales	72
Figure 19. La répression de l'expression de MYC induit une réduction de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les cellules cancéreuses colorectales	73
Figure 20. Identification, par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), de l'occupation du promoteur de la sous-unité $\alpha 1$ par MYC dans la lignée tumorale colique HT29	75
Figure 21. Images d'immunohistochimie représentatives de l'expression de MYC et de la sous-unité $\alpha 1$ dans les adénocarcinomes colorectaux et les marges appariées	77
Figure 22. Répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les cellules cancéreuses colorectales	81
Figure 23. Implication de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans la prolifération des cellules cancéreuses colorectales	82

Figure 24. Implication de l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ dans la résistance à l'anoïkose dans le cancer colorectal.....	84
Figure 25. Rôle de l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ dans la migration cellulaire.....	85
Figure 26. La réduction de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ réduit le développement des tumeurs colorectales en xénogreffes.....	87
Figure 27. La répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ entraîne une baisse du nombre des mitoses, des vaisseaux sanguins et une augmentation de la nécrose dans les xénogreffes	88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Tumeur primitive (T) dans la classification TNM.....	10
Tableau II.	Métastases ganglionnaires (N) dans la classification TNM	11
Tableau III.	Localisation dans d'autres organes (M) dans la classification TNM	11
Tableau IV.	Regroupement par stade	11
Tableau V.	Amorces utilisées pour le qPCR en temps réel	37
Tableau VI.	Liste des anticorps utilisés	40
Tableau VII.	Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.....	43
Tableau VIII.	Séquence des amorces utilisées pour l'immunoprécipitation de la chromatine	46
Tableau IX.	Séquence des sh-ARNs	46
Tableau X.	Paramètres histopathologiques et caractérisation moléculaire des tumeurs de patients de la série des cancers colorectaux de la banque des tissus ...	58
Tableau XI.	Récapitulatif des scores d'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les tumeurs comparés aux scores des marges de résection correspondantes	62
Tableau XII.	Évaluation de l'expression de MYC (protéine) et le messenger (<i>ITGA1</i>) et la protéine de la sous-unité $\alpha 1$ dans différentes lignées cancéreuses colorectales.....	71
Tableau XIII.	Corrélation entre l'expression de MYC et de la sous-unité $\alpha 1$ dans les adénocarcinomes colorectaux.....	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AOM:	azoxyméthane
APC:	<i>adenomatosis polyposis coli</i>
BIN1:	<i>bridging integrator-1</i>
CBP:	<i>CREB binding protein</i>
CCR:	cancer colorectal
CIMP:	<i>CpG island methylator phenotype</i>
DNMTs:	<i>DNA methyltransferases</i>
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
ERK:	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FAK:	<i>focal adhesion kinase</i>
GI:	tractus gastro-intestinal
GSK3 β :	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
HATs:	<i>histones acetyltransferases</i>
HDACs:	<i>histone deacetylases</i>
HGFR:	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
hMLH1:	<i>human mutL homolog 1</i>
hMSH2:	<i>human mutS homolog 2</i>
hMSH6:	<i>human mutS homolog 6</i>
HNPCC:	<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer.</i>
ISEL	<i>in situ Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling</i>
KRAS:	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
LOH:	<i>loss of heterozigosity</i>
MB :	membrane basilaire
MEC :	matrice extracellulaire
MEK:	<i>mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
Miz-1:	<i>Myc-interacting zinc-finger protein-1.</i>

MMR: *mismatch repair*
PMS2 PMS1 homolog 2, mismatch repair system component
MSI: *microsatellite instable*
PAF: *polypose adénomateuse familiale.*
PI3CA: *phosphatidylinositol 3-kinase.*
polyHEMA: *poly 2-hydroxyethyl methacrylate*
RTK *récepteurs tyrosine kinase*
SMAD4: *SMAD Family Member 4*
TCF: *T-cell factor*
TGF β R: *Transforming growth factor β receptor*

1. Introduction:

1.1. Le côlon dans le tractus gastro-intestinal :

Le tractus gastro-intestinal (GI) est fait d'une série d'organes tubulaires incluant l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. À ce tube s'associent le foie et le pancréas qui représentent des glandes accessoires déversant leurs produits dans ce tube. La fonction principale de ce système, avec la participation mécanique de la cavité buccale et enzymatique des glandes salivaires, est de convertir les aliments en nutriments essentiels et de les absorber dans le corps tout en éliminant les déchets inutiles à l'organisme. La majeure partie de la digestion et de l'absorption se produit au niveau de l'intestin grêle qui est subdivisé en trois parties distinctes : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La paroi de ce dernier est équipée de plis circulaires, de villosités qui sont des projections de la muqueuse en doigt de gant, et de microvillosités à la surface des cellules absorbantes. Ensembles, ces structures constituent une surface d'absorption pouvant atteindre 600 m² (Reinus et Simon 2014). La partie distale de l'intestin grêle se termine dans le côlon qui a la forme d'un cadre composé de plusieurs sections : le cæcum, côlon ascendant, transverse, descendant, et le sigmoïde qui se termine dans le rectum. En plus d'assurer l'acheminement et l'élimination des résidus alimentaires sous forme de matières fécales, le côlon a d'importantes fonctions métaboliques incluant l'absorption de l'eau et des électrolytes ainsi que des activités oxydatives et fermentatives impliquant la microflore bactérienne commensale (Mills 2007). La paroi colique comporte des valvules conniventes semi-circulaires, et elle est composée des quatre couches caractéristiques des organes du tractus GI. Il s'agit de la muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse et la séreuse (Reinus et Simon 2014). La structure des trois dernières couches est sensiblement semblable pour les organes du tractus GI, alors que la structure de la muqueuse, qui fait directement face à la lumière tubulaire, est spécifique à chacun de ces organes. La muqueuse colique est à surface plutôt plate, sans villosité, revêtue par un épithélium simple uni-stratifié qui présente des invaginations parallèles dans la muqueuse formant des cryptes ou les glandes de Lieberkühn (figure 1). Comme pour les autres organes du tractus GI, la sous muqueuse colique est faite d'un tissu conjonctif lâche

comportant de larges vaisseaux sanguins et lymphatiques, des neurones sympathiques et les plexus nerveux parasympathiques de Meissner. La musculature est composée d'une couche circulaire interne continue et une couche longitudinale externe discontinue, entre lesquelles se trouvent les plexus ganglionnaires d'Auerbach nécessaires à la contractilité musculaire et l'action propulsive. La couche musculaire externe est revêtue par une séreuse composée d'un tissu adipeux recouvert par une couche de cellules mésothéliales du péritoine. Le rectum est totalement intrapéritonéal dans sa partie proximale, recouvert de péritoine comme pour le côlon, alors que sa moitié distale est entourée des tissus mous du pelvis. Cette singularité constitue une limite chirurgicale importante dans l'analyse des pièces de résection rectales.

1.2. La muqueuse du côlon

- L'épithélium

Il est composé d'une couche de cellules cylindriques polarisées qui recouvrent la surface de la muqueuse et celle des cryptes et reposent sur une membrane basale qui les sépare des cellules de la lamina propria (figure 1). Ces cellules sont renouvelées à partir de cellules souches progénitrices localisées dans le fond des cryptes et qui assurent le renouvellement continu des cellules épithéliales. Ces cellules souches, qui prolifèrent lentement, donnent naissance à une population de cellules transitoires qui se divisent rapidement et migrent vers la surface pour donner naissance aux différents types cellulaires de l'épithélium de la muqueuse colique. Les cellules à mucus ou caliciformes sont les plus nombreuses et sont localisées dans la crypte (Mills 2007). Au niveau de l'épithélium de surface, quelques-unes de ces cellules sont intercalées entre les colonocytes de type absorbant qui représentent 10 à 15 % des cellules épithéliales. Les cellules entéroendocrines, à noyau apical et à cytoplasme granulaire basal, sont des éléments isolés localisés dans la moitié inférieure et le fond de la crypte. À ce niveau sont présentes quelques cellules de Paneth, observées seulement au niveau du côlon droit du fait de son origine de l'intestin moyen embryonnaire (Mills 2007). Ces cellules ne sont présentes dans le côlon gauche que dans des cas pathologiques comme les maladies

inflammatoires intestinales (Tanaka et al., 2001). L'épithélium de surface comporte également des lymphocytes intraépithéliaux, observés dans les zones surplombant les amas lymphoïdes et ont un rôle immunitaire.

- La membrane basilaire épithéliale :

La membrane basilaire (MB) est une structure spécialisée et dynamique composée d'éléments de la matrice extracellulaire (MEC). Elle assure l'ancrage des cellules de l'épithélium de surface et les sépare des cellules mésenchymateuses. Ces deux types cellulaires assurent conjointement la production des composants de cette membrane dont l'épaisseur est d'environ 1 μm . Cette membrane est composée d'une lame basale faite de collagènes, de glucosaminoglycanes et de glycoprotéines qui peuvent provenir des cellules épithéliales et mésenchymateuses et d'une lame réticulaire plus ou moins épaisse et dont les éléments sont principalement produits par les cellules mésenchymateuses. Cette MB présente une structure fenêtrée permettant les échanges entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses, le passage de cellules immunitaires, les échanges et le transport d'eau, d'électrolytes et d'autres molécules dans les deux directions (Timpl 1996). La MB est constituée, comme partout ailleurs dans le corps, de laminines, de collagènes (principalement le collagène IV), de protéoglycanes, de protéines de liaison de calcium tels que la fibulline, et diverses autres protéines de structure (Timpl 1996). Les cellules épithéliales sont étroitement en contact avec les différents composants de la MB par l'intermédiaire de différents récepteurs membranaires incluant les intégrines (Beaulieu 1997). De ce fait, la MB peut influencer différentes fonctions des cellules épithéliales dont la prolifération, la survie, la migration, la différenciation, l'adhésion et la transcription des gènes (Paulsson 1992; Beaulieu 1997; Teller et Beaulieu 2001; Miner et Yurchenco 2004; Groulx et al., 2011). La MB est en renouvellement continue et son intégrité est essentielle notamment dans le processus de la cicatrisation des blessures (Seltana et al., 2010), alors que l'altération de sa composition est souvent observée au cours des maladies inflammatoires intestinales (Li et Thompson 2003;

Seltana A 2012) et sa rupture est un évènement crucial dans l'invasion tumorale (Pujuguet et al., 1994; Ikeda et al., 2006) .

- Le chorion de la muqueuse :

Il s'étend de la MB épithéliale jusqu'à la musculaire muqueuse et comporte des myofibroblastes et une mixture d'éléments immunitaires épars dont des lymphocytes et des macrophages qui sont souvent à la base des cryptes. Les myofibroblastes sont des cellules allongées disposées en une fine couche sous la MB de l'épithélium de surface et des cryptes autour desquelles elles forment un véritable syncytium (Powell et al., 1999). Elles interagissent étroitement avec les cellules épithéliales et influencent l'absorption des électrolytes et la production du mucus en plus d'être impliquées dans le maintien de la population des cellules souches (Powell et al., 1999). Ces cellules sont également impliquées dans la progression du cancer colorectal (CCR) par l'activation du TGF β 1 (Hawinkels et al., 2009). En effet, les fibroblastes associés au cancer (CAFs) expriment fortement TGF β 1 par rapport aux myofibroblastes entourant les cryptes coliques. Le traitement des CAFs *in vitro*, par ce facteur entraîne une augmentation de l'expression du TGF β 1 lui-même, ainsi que celle des métalloprotéases matricielles et le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor) (Hawinkels et al., 2014). Il est à noter que l'augmentation de la phosphorylation de Smad2, une cible du TGF β 1, dans les cellules épithéliales est associée à une baisse de la survie des patients. Une étude récente a montré que la signalisation par le TGF β peut être utilisée comme marqueur prédictif de survie après traitement et que cette signalisation, dans les CAFs, est importante pour l'initiation de la métastase des cellules cancéreuses (Calon et al., 2012).

A l'instar des autres muqueuses du tractus GI, le chorion de la muqueuse du côlon et celui de l'intestin grêle a la particularité d'être exempt de vaisseaux lymphatiques. Ceux-ci sont présents dans la sous muqueuse. De ce fait, les adénocarcinomes localisés uniquement dans la muqueuse colique sont donc considérés comme *in situ* car ils ont beaucoup moins de risque de donner des métastases à ce niveau. Les fonds des cryptes alignées de la

muqueuse sont soulignés par la musculaire muqueuse qui est composée de deux fines couches de cellules musculaires lisses circulaire interne et longitudinale externe.

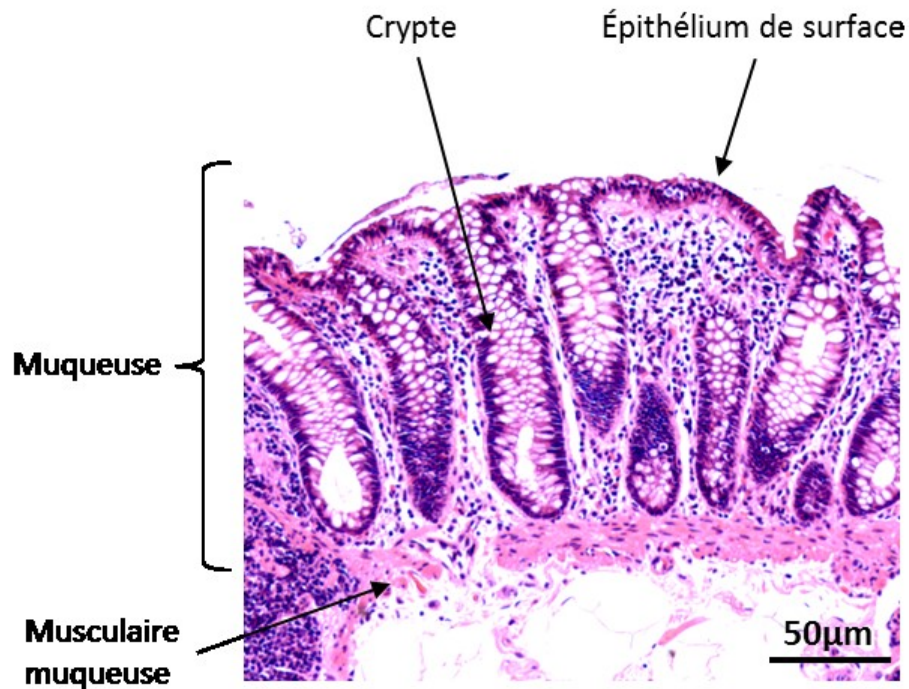


Figure 1. La muqueuse colique normale. L'épithélium de revêtement est majoritairement fait de cellules caliciformes et il s'invagine dans la muqueuse pour former les cryptes de Lieberkühn. Le chorion entourant les cryptes est riche en lymphocytes diffus. La musculaire muqueuse est faite de cellules musculaires lisses qui séparent la muqueuse de la sous muqueuse. Coloration hématoxyline et éosine.

1.3. Le cancer colorectal

1.3.1. Épidémiologie :

Le CCR représente le troisième cancer le plus commun dans le monde avec plus de 1,36 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2012 (Ferlay et al., 2015). Plus de la moitié des cas surviennent dans les pays développés dont le Canada, qui est parmi les 20 pays les plus touchés par ce cancer. Au Canada, on estime qu'en 2015 le CCR représentera près de 14% des nouveaux cas de cancers pour les hommes et près de 12% chez les femmes. Ce cancer représentera en 2015 la deuxième cause de mortalité par cancer chez les hommes, après le cancer du poumon, et la troisième chez les femmes après les cancers du poumon et du sein. La survie à 5 ans est estimée à 65% pour les deux sexes. Toutefois l'incidence du CCR est en baisse depuis les années 2000 grâce aux nouveaux moyens de dépistage précoce chez les personnes de plus de 50 ans et la résection des lésions pré-néoplasiques chez les patients sélectionnés pour un examen de coloscopie. Malgré les moyens de diagnostic précoce, le risque de développer un CCR reste présent notamment en raison de facteurs avérés favorisant comme la surconsommation de viandes rouges et transformées et l'alcool (Moskal et al., 2007; Miller et al., 2013; Bernstein et al., 2015; Carr et al., 2016). D'autres facteurs de risque favorisant incluent l'obésité, l'adiposité abdominale et la sédentarité, alors que l'activité physique et la consommation d'aliments riche en fibres et en calcium seraient protectrices (Aune et al., 2011; Galas et al., 2013).

1.3.2. Développement et caractéristiques du cancer colorectal

Le développement de l'adénocarcinome colorectal survient à la suite d'anomalies génétiques et épigénétiques entraînant l'accumulation progressive et successive de nombreuses altérations incluant l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces événements sont la conséquence soit de l'instabilité chromosomique, l'instabilité des microsatellites ou la méthylation de l'ADN. Les altérations à l'origine de ce cancer peuvent être soit sporadique ou germinales. Dans cette catégorie sont classés la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le syndrome de Lynch ou HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*). C'est l'étude des cancers

colorectaux familiaux qui a permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans son développement.

- Voie de l'instabilité chromosomique (cancers LOH+) :

Cette voie, connue également sous le nom de la séquence adénome-cancer, est caractérisée par la survenue d'évènements génétiques associés à des modifications histopathologiques caractéristiques. L'inactivation du gène APC (*adenomatosis polyposis coli*) (Jen J et al, 1994), soit par mutations germinales ou sporadiques, est la plus précoce et survient au stade de crypte aberrante et l'adénome précoce. Cette mutation est observée dans 85% des adénocarcinomes colorectaux (Kerr, 2003) entraînant une perte de fonction de la protéine APC, et de ce fait l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, connue pour son implication dans la prolifération cellulaire et la progression du CCR (Kolligs et al., 2002; Yang et al., 2014). Au cours du stade d'adénome tardif survient la mutation activatrice du proto-oncogène KRAS (*Kirsten rat sarcoma*), qui conduit à l'activation de la voie RAS (Rat sarcoma)/MEK (*mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase*)/ERK (*extracellular signal-regulated kinases*). L'oncogène Kras est présent dans 50% des adénomes de taille supérieure à 1 cm (Vogelstein et al, 1988), et représente actuellement un marqueur de non-réponse thérapeutique au Cetuximab® dans le traitement du cancer colorectal métastatique. La mutation du gène de la protéine 53 (p53) survient au cours de la transition de la dysplasie de haut grade vers le carcinome *in situ* (Armaghany et al., 2012; Xu et al., 2012). Cette mutation conduit à une perte du suppresseur de tumeurs p53 et le gain d'un oncogène représenté par les formes mutés de p53 (Brosh et Rotter 2009; Muller et Vousden 2013). La perte de p53 est un marqueur prédictif de résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie (Ferreira et al., 1999). D'autres évènements sont associés à cette voie, notamment la mutation inactivatrice des SMAD4 (*SMAD Family Member 4*) et les mutations activatrices du TGF β R (*transforming growth factor β receptor*) et celle de PI3KCA (*phosphatidylinositol 3-kinase*).

- Instabilité des microsatellites

Elle survient suite à la désactivation d'un des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN. Le phénotype MSI (microsatellite instable) est observé dans 95% des syndromes HNPCC et il est associé à une mutation d'un ou plusieurs des gènes *hMLH1* (*human mutL homolog 1*), *hMSH2* (*human mutS homolog 2*), *hMSH6* (*human mutS homolog 6*) et *PMS2* (*PMS1 homolog 2, mismatch repair system component*) (Wang et al., 1999; Boland et Goel 2010). Ce phénotype est observé dans 15 à 20% des adénocarcinomes sporadiques et il est souvent associé à la méthylation et l'inactivation du gène *hMLH1* (Nakagawa et al., 2001). Les CCR avec MSI sont souvent associés à une mutation activatrice de *B-RAF* (Kambara et al, 2004) et comportent un infiltrat lymphocytaire dense péri-tumoral. Les cancers MSI sporadiques sont souvent peu différenciés, mucineux et de localisation proximale dans le cadre colique. En clinique, le phénotype MMR (*mismatch repair*) est confirmé soit par séquençage de l'ADN soit par immunohistochimie. Le CCR est dit *MSI-High* (MSI-Hi) si l'instabilité est présente dans 30% ou plus des marqueurs, *MSI-Low* (MSI-L) si entre 10 et 20% et MSS (microsatellite stable) s'il n'y a pas de marqueurs d'instabilité dans le tissu tumoral.

- Méthylation des îlots CpG

Il s'agit de la méthylation aberrante des éléments CpG dans les promoteurs de certains gènes conduisant à la répression de leur expression dans certains cancers colorectaux, leur attribuant le phénotype CIMP (*CpG island methylator phenotype*). Ce mécanisme est responsable de l'inactivation de *hMLH1* dans le CCR sporadique avec MSI et il est souvent associé à la mutation oncogénique de *B-RAF* (V600E) (Weisenberger et al., 2006).

1.3.3. Histologie du cancer colorectal

- Le foyer de cryptes aberrantes

Représente l'un des premiers changements observés dans les muqueuses du côlon et du rectum pouvant évoluer vers un adénome puis vers l'adénocarcinome. Ce sont des glandes tubulaires anormalement élargies et de forme irrégulière avec très peu de muco

sécrétion (Pretlow et al., 1991). Il peut s'agir soit d'une seule crypte aberrante voir un groupe de plus de 30 cryptes irrégulières que l'on peut facilement détecter grâce au bleu de méthylène. Ces foyers sont tapissés par des cellules hyper-prolifératives et dysplasiques. Les cellules prolifératives sont observées dans toute la hauteur de la crypte.

- L'adénome

Ce sont des lésions polyploïdes ou planes, sessiles ou pédiculées. Histologiquement, la lésion est faite de formations tubulaires, villeuses ou mixtes avec hyperprolifération cellulaire dans les cryptes soulevant la muqueuse colique et aboutissant à la formation d'un adénome. Selon le degré de dysplasie, les adénomes sont divisés en deux catégories soit de bas et haut grade. L'adénome avec dysplasie de haut grade peut évoluer, en plusieurs années, vers l'adénocarcinome colorectal (Lieberman et al., 2012).

L'adénocarcinome :

Il s'agit le plus souvent d'un adénocarcinome Lieberkühnien (85%), se développant à partir des cryptes. La tumeur est faite de structures tubulaires ou glandulaires de forme et de taille variables (tubulaires, acineuses ou papillaires) envahissant les différentes structures de la paroi colique. La cellule tumorale est de grande taille, de cubique à cylindrique et a souvent un cytoplasme abondant éosinophile peu muco-sécrétant et à limites nettes. Le noyau des cellules est souvent vitreux, mais peut avoir une chromatine dense, avec un nucléole proéminent et des contours irréguliers. Les tumeurs épithéliales du côlon et du rectum sont classées, selon la prédominance des formations glandulaires en adénocarcinomes bien différenciés (95% de la tumeur), moyennement différenciés (50-95% de formations glandulaires), peu différenciés (glandes entre 5-50% de la tumeur) et indifférenciés (moins de 5% de formations glandulaires)(Aaltonen et al., 2000). Bien que rares, il existe deux autres sous-classes d'adénocarcinomes dans le côlon. Quand le cancer comporte plus de 50% de mucine, il s'agit d'un adénocarcinome mucineux. Le cancer est classé en adénocarcinome à cellules en bague à chaton, si cette composante

dépasse 50% de la tumeur. Ces deux types surviennent respectivement dans 10-15% et 0.1-2,4% des cas (Pande et al., 2008). Ces deux types de tumeurs sont considérés comme des adénocarcinomes peu différenciés (Aaltonen et al., 2000). Si la tumeur comporte moins de 50% de ces deux critères, on parle d'adénocarcinome avec composante mucineuse ou en bague à chaton, car le pronostic peut être différent selon leur présence et leur proportion dans les tumeurs colorectales (Borger et al., 2007; Pande et al., 2008; Tan et al., 2015)

1.3.4. Classification anatomoclinique (TNM et regroupement en stades) :

Après examen histologique, l'adénocarcinome colorectal est classé selon l'extension dans la paroi et l'atteinte éventuelle de ganglions lymphatiques, en utilisant des classifications internationalement reconnues, la plus utilisées est la classification TNM (*T: tumour size, N: nodes, M: metastasis*) de l'organisation mondiale de la santé (OMS). Elle regroupe les tumeurs en fonction de leur taille ou du degré d'envahissement pariétal (T, voir tableau I), du statut des ganglions régionaux (N, voir tableau II) et de la présence ou non de métastases (M, voir tableau III). Dans un but de prise en charge thérapeutique, les tumeurs sont ensuite regroupées en stade (voir tableau IV).

Tableau I. Tumeur primitive (T) dans la classification TNM.

Tis	Tumeur confinée à la muqueuse
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculature
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonisés
T4	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures et/ou perforant le péritoine viscéral

Tableau II. Métastases ganglionnaires (N) dans la classification TNM.

N0	Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N2	Métastases dans plus de 4 ganglions lymphatiques régionaux

Tableau III. Localisation dans d'autres organes (M) dans la classification TNM.

M0	Pas de métastase.
M1	Présence de métastases.

Tableau IV. Regroupement par stade

	TNM		
Sade 0	Tis (in situ)	N0	M0
Stade I	T1, T2	N0	M0
Stade II	T3, T4	N0	M0
Stade III	Quel que soit T	N1, N2	M0
Stade VI	Quel que soit T	Quel que soit N	M1

1.4. Le facteur oncogénique MYC

Le proto-oncogène MYC est l'un des facteurs de transcription les mieux connus pour son implication dans la carcinogenèse et la progression de plusieurs types de cancers agissant comme un régulateur principal de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, l'invasion, l'apoptose, le métabolisme ainsi que la synthèse et la réparation de l'ADN (Dang 2012; Luscher 2012). MYC fait partie d'une famille de trois membres incluant N-MYC et L-MYC. MYC fonctionne comme un facteur de transcription et s'associe avec son partenaire MAX créant un hétérodimère qui se lie à l'ADN au niveau de la séquence consensus 5'-CANNTG-3' nommée E-box (Dang 2012; Luscher 2012), pour activer la transcription de ses gènes cibles, par exemple suite à des signaux prolifératifs. Dans un autre contexte, comme la différenciation cellulaire, c'est le facteur MAD qui entre en compétition avec MYC pour se lier avec MAX et réprimer les mêmes gènes cibles de MYC (figure 2) (Ayer et al., 1993). La répression de l'expression de certains gènes se fait aussi par la liaison de MYC au facteur Miz-1 (*Myc-interacting zinc-finger protein-1*) (Gebhardt et al., 2006), ce qui empêche la liaison de Miz-1 au complexe CBP/p300 et favorise le recrutement des Dnmts (*DNA methyltransferases*), dont Dnmt3a, qui entraînent la méthylation des promoteurs et la répression de la transcription (figure 2) (Brenner et al., 2005). La dérégulation de MYC dans le cancer peut être la conséquence de plusieurs altérations dont les mutations géniques, l'amplification (augmentation du nombre de copies), mais aussi la régulation par différentes voies de signalisations comme la voie Wnt/ β -caténine et la voie RAS/MEK/ERK (Dang 2012), toutes les deux souvent actives dans le cancer colorectal. Dans la première voie, c'est la β -caténine qui, une fois échappée à la dégradation par le complexe APC/Axin/GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*), diffuse au noyau et augmente la transcription du gène *MYC* par sa liaison au facteur de transcription TCF (*T-cell factor*). L'activation de la voie Wnt/ β -caténine entraîne l'inhibition de la GSK3 β par *Dishevelled*, ce qui empêche la phosphorylation de MYC sur la thréonine 58 et prévient sa dégradation par le protéasome (figure 3). D'autre part, la phosphorylation de MYC par ERK sur la sérine 62 favorise sa stabilisation. Une fois dans le noyau, MYC va contrôler plusieurs gènes, environ 15 % des gènes, car la séquence

canonique CACGTG est fréquemment observée dans le promoteur de plusieurs gènes dont ceux qui codent pour certaines intégrines qui font parties des cibles de MYC.

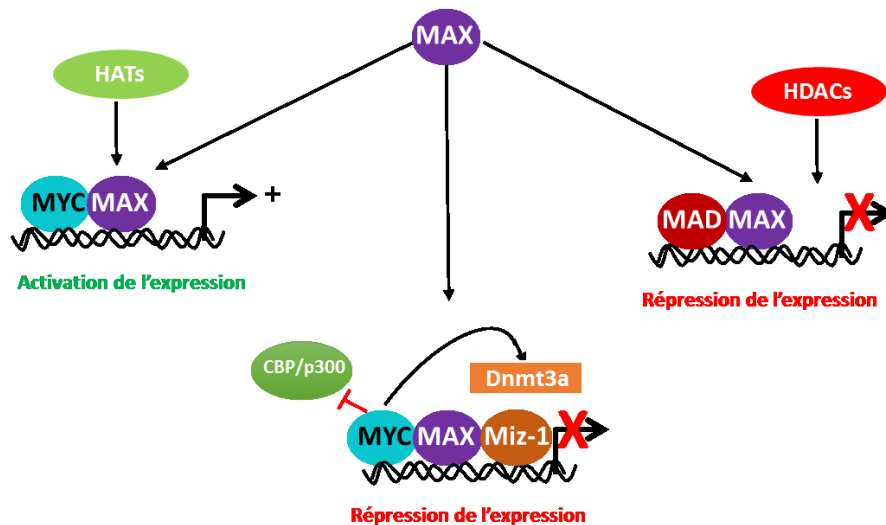


Figure 2. Le réseau MYC/MAX/MAD et leur activité transcriptionnelle. L'hétérodimère MYC/MAX une fois lié sur l'ADN au niveau d'un élément E-Box recrute différents facteurs comme TBP et TRRAP (non représentés sur la figure) ainsi que les HATs (*histones acetyltransférases*), ce qui permet l'acétylation des histones et un changement de la configuration de la chromatine pour faciliter la transcription des gènes cibles. L'interaction de MYC/MAX avec Miz-1, empêche la liaison de ce dernier avec les cofacteurs CBP/p300 et entraîne le recrutement des méthyltransféraes de l'ADN, dont Dnmt3a, qui vont induire la méthylation des régions promotrices au niveau des îlots CpG et réprimer l'expression de certains gènes cibles comme *P15INK4B* et *P21*. En compétition avec MYC/MAX, c'est le complexe MAD/MAX qui va se lier sur les mêmes E-box et va recruter Sin3, N-CoR (non représentés sur le schéma) et les HDACs (*histone deacetylases*), ce qui conduit la compaction de la chromatine et la répression de l'expression des gènes ciblés par MYC.

En effet, le promoteur des gènes *ITGA6*, *ITGB1* et *ITGB4* comportent une séquence E-Box (Fernandez et al., 2003), mais chez la souris, MYC réprime l'expression de ces gènes par sa liaison à Miz-1 (Gebhardt et al., 2006). À l'opposé, MYC est surexprimé dans plusieurs cancers dont le cancer colorectal (Erisman et al., 1985; Sikora et al., 1987; Rochlitz et al., 1996) et dans les cellules cancéreuses il augmente l'expression d'*ITGB4* (Ni et al., 2005) et *ITGA6* (Groulx et al., résultats non publiée), ce qui se traduit par l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha6\beta4$. Celle-ci va, à son tour, promouvoir la signalisation de la voie WNT/ β -caténine en stabilisant *Dishevelled* qui va maintenir l'inhibition de la GSK3 β , ce qui stabilise MYC et augmente son expression (figure 3). Il est à noter que l'intégrine $\alpha6\beta4$, dont l'expression n'est pas augmentée dans les cellules cancéreuses colorectales, inhibe leur prolifération ainsi que l'activité de MYC (Dydenborg et al., 2009; Groulx et al., 2014) par un mécanisme qui impliquerait la liaison de la queue cytoplasmique de la sous-unité $\alpha6\beta$ au facteur inhibiteur de MYC, BIN1 (*bridging integrator-1*). En fait, BIN1 inhibe l'activité transcriptionnelle de MYC par plusieurs mécanismes (Elliott et al., 1999) mais l'implication directe de l'intégrine $\alpha6\beta4$ n'est pas encore bien établi. Au total, ces constatations suggèrent l'existence d'une boucle de régulation positive entre MYC et les intégrines, en tenant compte aussi de la régulation de MYC par la voie RAS/MEK/ERK. Cette voie peut être sous le contrôle de plusieurs récepteurs membranaires dont les RTK (récepteurs tyrosine kinase) et certaines intégrines.

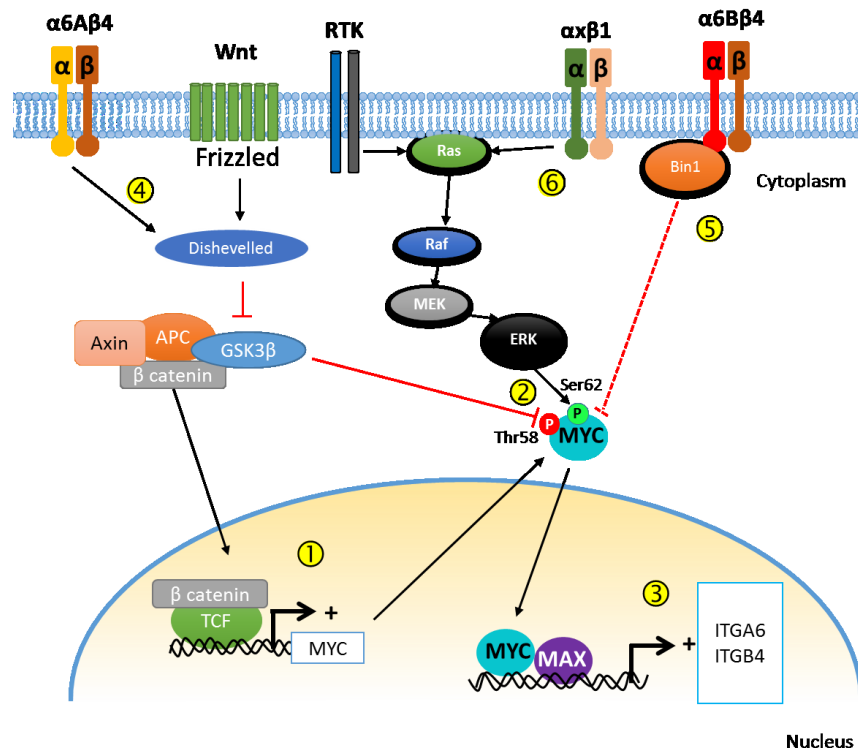


Figure 3. Régulation de MYC et sa relation avec les voies de signalisation liées aux intégrines. La voie Wnt/β-caténine, une fois active, contrôle l'expression du facteur oncogénique MYC (1), mais aussi sa stabilisation par l'inhibition de la GSK3β (2) sous l'effet de *Dishevelled*. Quand la voie RAS/MEK/ERK est active, ERK phosphoryle MYC pour inhiber sa dégradation (2). Une fois dans le noyau, MYC augmente l'expression de plusieurs gènes dont *ITGA6* et *ITGB4* (3). D'un autre côté l'intégrine α6Aβ4 active *Dishevelled* dans la voie Wnt/β-caténine (4) et augmente l'expression de MYC alors que α6Bβ4 inhibe l'activité de MYC (5). Les récepteurs tyrosine kinase et d'autres intégrines β1 peuvent réguler positivement la voie RAS/MEK/ERK (6) et stabilisent MYC. Adapté de (Boudjadi et Beaulieu 2016).

1.5. Les intégrines :

Ce sont des récepteurs transmembranaires faits de la liaison non covalente entre une sous-unité α et une sous-unité β , et qui participent à la liaison des cellules aux composants de la matrice extracellulaire et à certaines liaisons spécialisées des cellules entre elles. À date, on a identifié 8 sous-unités β et 18 sous-unités α , qui forment 24 intégrines différentes dans leur composition mais aussi leur localisation, leur expression et leur rôle dans les conditions physiologiques et pathologiques. Les intégrines permettent d'assurer l'intégrité de la liaison du cytosquelette de la cellule à la MEC, d'où leur nom. Les sous-unités α et β sont totalement distinctes, avec aucune homologie détectable entre elles. L'identité de séquence entre les sous-unités α est d'environ 30% et celle des sous-unités β est de 45%, ce qui indique que les deux familles de gènes codant pour les sous-unités α et β ont évolué par duplication de gènes (Takada et al., 2007). Les intégrines peuvent être classées selon leur ligand et leur appartenance en quatre groupes : le groupe des intégrines qui reconnaissent la séquence d'acides aminés GFOGER (O: hydroxyproline) présente dans le collagène, le groupe des intégrines récepteurs de la laminine, les intégrines qui reconnaissent la séquence RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) présente dans la fibronectine, vitronectine et fibrinogène, et le groupe des intégrines spécifiques aux leucocytes (figure4) (Takada et al., 2007; Barczyk et al., 2010). Les deux sous-unités des intégrines ont chacune une extrémité N-terminal extracellulaire formant un domaine globulaire de liaison au ligand. Cette partie repose sur un domaine transmembranaire qui se termine par une courte extrémité C-terminal intra cytoplasmique. Du côté extracellulaire, la sous-unité α est composée d'un domaine à 7 feuillets beta incorporant le domaine I (inséré) présent dans 8 sous-unités ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αL , αM , αX et αD) (Barczyk et al., 2010). Ce I domaine comporte un motif MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*) qui réalise un pont magnésium entre le récepteur et le ligand. Les deux derniers feuillets beta peuvent lier le calcium créant un encombrement stérique pouvant altérer la liaison au ligand. Le domaine à 7 feuillets est lié au domaine *tight*, C1 et C2 qui forment un pied de l'intégrine relié au domaine transmembranaire. C'est la sous-unité α qui détermine la spécificité de liaison au ligand (Barczyk et al., 2010) et la composition de

sa queue cytoplasmique varie selon le type de sous-unité et permet l'activation de voies de signalisation différentes (Giancotti 2000).

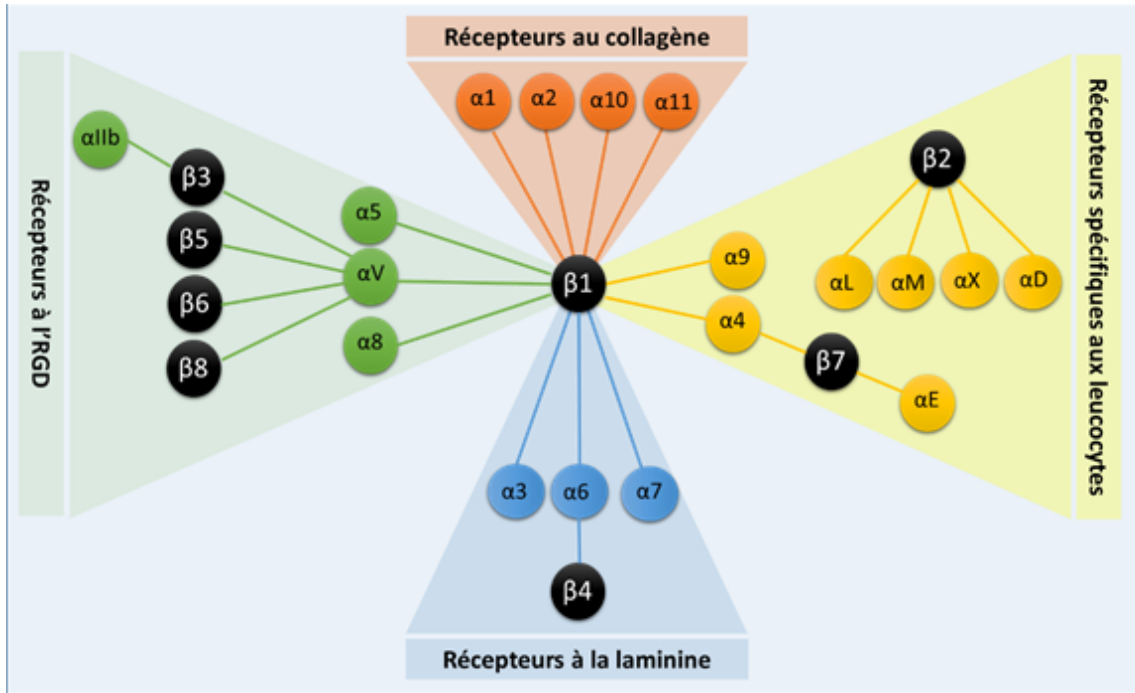


Figure 4. La super famille des intégrines. Il existe chez les mammifères 24 hétérodimères d'intégrines formés par la combinaison de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . Cette figure montre une classification des intégrines selon leur spécificité de liaison mais aussi selon leur appartenance. Les sous-unités β sont représentés avec des cercles noirs alors que les sous-unités α sont soit en orange pour les récepteurs au collagène, en vert pour les intégrines qui reconnaissent la séquence RGD, en bleu les récepteurs à la laminine et en jaune le groupe des intégrines exprimées dans les leucocytes. Les intégrines récepteurs au collagène peuvent reconnaître la séquence d'acide aminé GFOGER, l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ en fait partie et à une plus grande affinité pour le collagène IV.

La sous-unité β comporte 7 domaines. Le domaine Plexin-semphahorin-integrin (PSI), le domaine I, le domaine hybride et 4 domaines de répétition *EGF-like* pour former l'autre pied de l'Intégrine. Le domaine β I, comportant le motif de liaison au Mg^{+2} et un motif adjacent ADMIDAS (*adjacent MIDAS*). Ce dernier peut lier le Ca^{2+} et intervient dans le changement de conformation (Humphries et al., 2003). Les cations bivalents peuvent influencer à la fois l'affinité et la spécificité de la liaison d'une intégrine à son ligand (Arnaout et al., 2005). À l'instar des récepteurs tyrosine kinase, les intégrines n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque mais elles ont la particularité d'assurer une signalisation dans deux directions opposées par un remarquable mécanisme de changement de conformation et d'affinité (Shattil et al., 2010). La liaison du ligand à l'intégrine entraîne l'activation de celle-ci et engendre une signalisation de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (figure 5). À l'opposé, la signalisation dans le sens intérieur-extérieur se fait du côté cytoplasmique où des molécules comme la taline ou la kindline vont forcer le changement de la conformation repliée inactive vers une conformation étendue d'affinité élevée pour le ligand (Shattil et al., 2010). Ces deux types d'activation des intégrines se font d'une manière synergique et coordonnée et peuvent s'influencer et se potentialiser mutuellement. En effet, l'activation de l'intégrine peut augmenter la force de liaison du ligand, et inversement, la liaison du ligand peut générer une signalisation intracellulaire. Les intégrines vont donc permettre à la cellule de réaliser un lien entre son cytosquelette et les éléments de la matrice extracellulaire par le recrutement de molécules comme la taline, la paxilline et FAK selon une organisation hiérarchique (Miyamoto et al., 1995; Parsons et al., 2010). Suivant le contexte, il s'agit des plaques d'adhésion et les adhésions focales pour les fibroblastes et les cellules épithéliales, de podosomes pour les macrophages et les ostéoclastes et d'invadopodes pour les cellules cancéreuses (Shattil et al., 2010). Une fois l'intégrine liée à son ligand, elle active plusieurs voies de signalisation via les sous-unités β et/ou α et, selon l'intégrine et les molécules recrutées, influence différents processus cellulaires dont la prolifération, la survie, l'adhésion, la migration, l'invasion, la différenciation et la transcription des

gènes (Giancotti 1997; Aplin et Juliano 1999; Gagne et al., 2010; Vachon 2011; Beausejour et al., 2012).

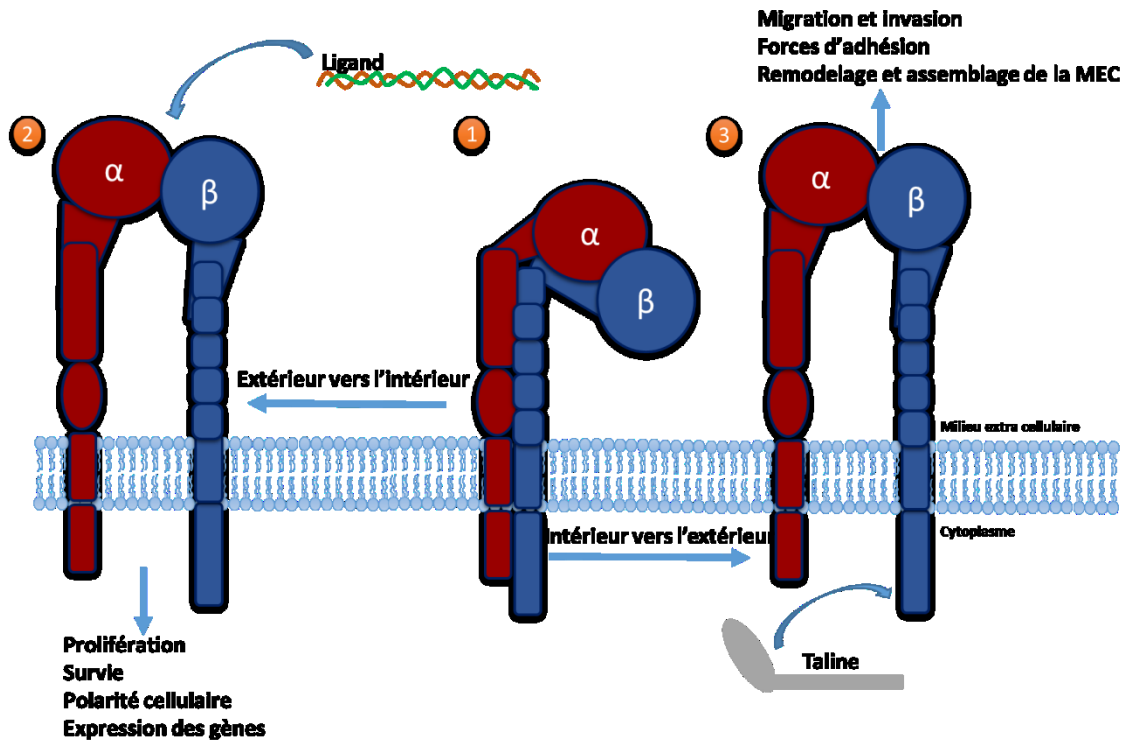


Figure 5. Activation et signalisation bidirectionnelle des intégrines. Les intégrines sont les seuls récepteurs membranaires de type II pouvant induire une signalisation dans deux sens différents avec des conséquences biologiques importantes pour la cellule. La liaison d'un ligand à l'intégrine entraîne un changement de sa conformation de repos repliée inactive (1) à une forme étendue et active (2). Les ligands multivalents permettent de regrouper et d'activer différentes intégrines dans les plaques d'adhésion, ce qui amplifie le signal. Les intégrines recrutent alors des molécules transductrices du signal pour activer plusieurs voies de signalisation, selon l'intégrine et les molécules recrutées, et influencer la prolifération, la survie, la polarité cellulaire ainsi que la régulation de l'expression de certains gènes. L'intégrine peut être activée à partir de l'intérieur de la cellule par plusieurs molécules comme la taline (3) augmentant sont affinité au ligand et permettant à la cellule de réguler les forces d'adhésion, de migrer et d'influencer le remodelage de la matrice extracellulaire.

1.6. Les intégrines dans l'intestin normal et dans le cancer colorectal :

Les cellules épithéliales intestinales expriment les intégrines de façon différentielle suivant leur position et leur état de différenciation le long l'axe crypte villosité, mais aussi selon la variation de la composition des constituants de la lame basale épithéliale sous-jacente, ce qui reflète leur implication dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal et leur rôle dans plusieurs fonctions dont la migration, la prolifération et la survie des cellules épithéliales intestinales normales (Beaulieu 1999). L'expression des intégrines varie aussi dans le cancer colorectal selon le type de l'hétérodimère mais elles sont rarement retrouvées mutées. Plusieurs études s'accordent sur leur implication dans les différentes étapes de progression de ce cancer par l'activation de voies de signalisation, l'interaction avec les constituants de la matrice extracellulaire leur conférant un rôle primordial, par exemple, dans l'invasion et la migration cellulaire (Bates 2005; Le Tourneau et al., 2007; Desgrosellier et Cheresch 2010; Onodera et al., 2013). Certaines intégrines sont présentes uniquement dans l'intestin fœtal comme $\alpha 8\beta 1$ (Lussier et al., 2000; Benoit et al., 2009) et $\alpha 9\beta 1$ (Dieckgraefe et al., 1996; Desloges et al., 1998). $\alpha 8\beta 1$ est absente dans le CCR et sa surexpression dans les cellules cancéreuses colorectales les sensibilise à l'anoïkose (Benoit et al., 2010), alors qu' $\alpha 9\beta 1$ est ré-exprimée dans les cellules tumorales des adénocarcinomes colorectaux et dans les lignées tumorales Caco-2/15 et T84 (Basora et al., 1998) mais son rôle est encore inconnu. L'expression des intégrines dans l'intestin et le CCR dépend aussi de certains variants d'épissage comme c'est le cas de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ qui compte cinq variants pour $\beta 4$ (A-E) et deux variants pour $\alpha 6$ (A et B). En effet, seulement $\beta 4A$ est présent dans l'épithélium intestinal (Basora et al., 1999) et c'est sa forme ctd+ qui est exprimée dans le CCR (Basora et al., 1998; Ni et al., 2005). Pour la sous-unité $\alpha 6$, le variant $\alpha 6B$ est associé à la zone différenciée de la villosité et a une action antiproliférative *in vitro*. Ce variant est, en fait, absent dans le CCR. Par contre, la sous-unité $\alpha 6A$ est présente au niveau des cellules prolifératives de la crypte (Dydensborg et al., 2009; Dydensborg et al., 2009), son expression est augmentée dans le CCR et elle régule positivement la voie Wnt/ β -caténine (Groulx et al., 2014). L'intégrine $\alpha 6\beta 4$, par le biais de $\beta 4$ active IRS1 et IRS2 pour réguler la voie PI3K/AKT (Shaw

2001) et régule la voie MAPK/ERK par le recrutement des molécules transductrices SHC/GRB2 (Wei et al., 1998). Les intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$, récepteurs au collagène, sont présentes uniquement dans la membrane basolatérale des cellules du compartiment prolifératif de la crypte de l'intestin, alors que $\alpha3\beta1$ est observée dans les cellules différenciées de la villosité intestinale ce qui correspond à la présence du ligand de cette dernière, les laminines 1 et 5, au niveau de la lame basale de la villosité (Beaulieu 1992; Beaulieu 1997; Beaulieu 1999). L'expression de l'intégrine $\alpha3\beta1$ diminue dans les adénomes (Stallmach et al., 1992) et le cancer colorectal (Pignatelli et al., 1990; Stallmach et al., 1992). Celle de $\alpha2\beta1$ est augmentée dans le CCR (Pignatelli et al., 1990). Récemment, il a été démontré que la cadhérine 17 active, via la liaison directe à l'intégrine $\alpha2\beta1$, la voie signalisation RAS/MEK/ERK et contribue à la prolifération et la métastase des cellules tumorales colorectales (Bartolome et al., 2014). L'implication de l'intégrine $\alpha1\beta1$ dans le cancer colorectal n'a pas été rapportée.

1.7. L'intégrine $\alpha 1\beta 1$.

La sous-unité $\alpha 1$, dont $\beta 1$ est l'unique partenaire, a le plus court domaine cytoplasmique (Gardner 2014) mais c'est la plus grosse sous-unité α avec un poids moléculaire apparent avoisinant 210 kDa principalement en rapport avec un haut degré de glycosylation. Elle a été découverte en 1986 comme l'antigène VLA1 (*very late antigen 1*) exprimé à la surface des lymphocytes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Hemler et al., 1986). L'intégrine $\alpha 1\beta 1$ constitue avec $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, et $\alpha 11\beta 1$, les principaux récepteurs au collagène IV. Elles reconnaissent, grâce à l'implication du domaine I, la séquence peptidique GFOGER répétitive sur ce constituant principale de la membrane basilaire épithéliale (Kern et Marcantonio 1998; Barczyk et al., 2010). La sous-unité $\alpha 1$ est largement exprimée dans le mésenchyme, notamment par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (Gardner 2014).

L'intégrine $\alpha 1\beta 1$ contribue à la régulation de la synthèse du collagène (Gardner et al., 1999) dans les fibroblastes, mais aussi à leur prolifération et leur survie (Pozzi et al., 1998) ainsi que celles des cellules endothéliales (Abair et al., 2008). Du point de vue fonctionnel $\alpha 1\beta 1$ se lie, par le domaine transmembranaire de la sous-unité $\alpha 1$, à la cavéoline-1, qui recrute à son tour les protéines adaptatrices Shc et Fyn qui activent ensuite la voie RAS/MEK/ERK (figure 6) (Pozzi et al., 1998; Wary et al., 1998; Giancotti 2000). Dans les cellules endothéliales, il a été démontré que certaines fonctions de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ nécessitent la présence d'acide-aminés spécifiques dans la queue cytoplasmique de la sous-unité $\alpha 1$, dont la proline 1142 et la leucine 1145 qui sont importantes pour l'activation de ERK, alors que la lysine 1146 est impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaires (régulation de p38). La substitution de la lysine 1151 rend la queue COOH chargée positivement, ce qui induit une perte complète des fonctions suscitées de cette intégrine. Dans les épithéliums, bien que rapportée généralement peu exprimée, $\alpha 1$ est présente au cours du développement dans le rein et l'épithélium cutané mais aussi chez l'adulte dans les cellules épithéliales de l'endomètre et les hépatocytes. Dans l'intestin grêle et le côlon, $\alpha 1$ est présente dans le compartiment des cellules épithéliales intestinales de la crypte et absente dans les cellules différenciées de la villosité et celles

de l'épithélium de surface de la muqueuse colique, alors que la sous-unité $\beta 1$ est exprimée par toutes les cellules de l'épithélium intestinal (Choy et al., 1990; MacDonald et al., 1990; Beaulieu 1992). Ce profil d'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans l'intestin est en corrélation avec le rôle pro-prolifératif de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ observé dans les fibroblastes, mais aussi sa surexpression dans certaines tumeurs. En effet, la sous-unité $\alpha 1$ est présente dans le lymphome T cutané (Stern et al., 1992) et les leiomyosarcomes (Mechtersheimer et al., 1994) alors que sa présence dans les mélanomes est controversée (Gardner 2014). Dans les tumeurs épithéliales, $\alpha 1$ est observée dans l'adénocarcinome bronchioalvéolaire, les tumeurs carcinoïdes (Koukoulis et al., 1997) et le carcinome épidermoïde primitif du poumon, pour lequel l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ corrèle avec son caractère métastatique (Gogali et al., 2004). Dans le modèle murin de cancer pulmonaire non à petites cellules, les souris invalidées pour $\alpha 1$ développent des tumeurs de petite taille et moins nombreuses que les souris contrôle, avec une baisse importante de la vascularisation de ces tumeurs qui est en rapport avec une production accrue des MMP9 (métalloprotéinases matricielles 9), qui induisent à leur tour une augmentation de la production de l'angiostatine, ce qui inhibe la croissance des cellules endothéliales (Pozzi et al., 1998; Chen et al., 2005). Les souris invalidées pour $\alpha 1$ ont une survie plus importante que les souris contrôles et ce même en présence d'un *KRAS* muté. Ce phénotype est en rapport avec une baisse de la phosphorylation de ERK et une augmentation de l'activation de p38 dans les tumeurs développées (Macias-Perez et al., 2008). D'autre part, $\alpha 1\beta 1$ contribue à l'invasion des cellules tumorales des carcinomes des poumons et du foie (Lochter et al., 1999; Yang et al., 2003). Cet effet a été démontré *in vitro*, dans le cancer colorectal, par une seule étude qui rapportait que $\alpha 1\beta 1$ recrute le complexe paxilline/taline ce qui permet l'activation de FAK/Src puis celle de p130Cas/c-Jun (figure 6) (Van Slambrouck et al., 2007). À date, aucune autre fonction d' $\alpha 1\beta 1$ n'a été étudiée, et l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ et sa régulation dans ce cancer ne sont pas encore connues. En fait, la première description de la régulation transcriptionnelle de la sous-unité $\alpha 1$ a été rapportée dans les cellules musculaires lisses où son expression peut être régulée par le facteur SFR (*serum response factor*) sur la boîte CAR_G, qui est située

sur le promoteur du gène *ITGA1* (intégrine alpha 1) à 400 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (Obata et al., 1997). D'autre part, Cheli et al ont rapporté que l'expression du gène *ITGA1* est réprimée, et non celle du gène *ITGA2* (intégrine alpha 2), par méthylation de son promoteur durant la différenciation des cellules hématopoïétiques mononuclées en mégacaryocytes (Cheli et al., 2007). Ce type de régulation de la sous-unité $\alpha 1$ n'a pas été rapporté dans d'autres tissus.

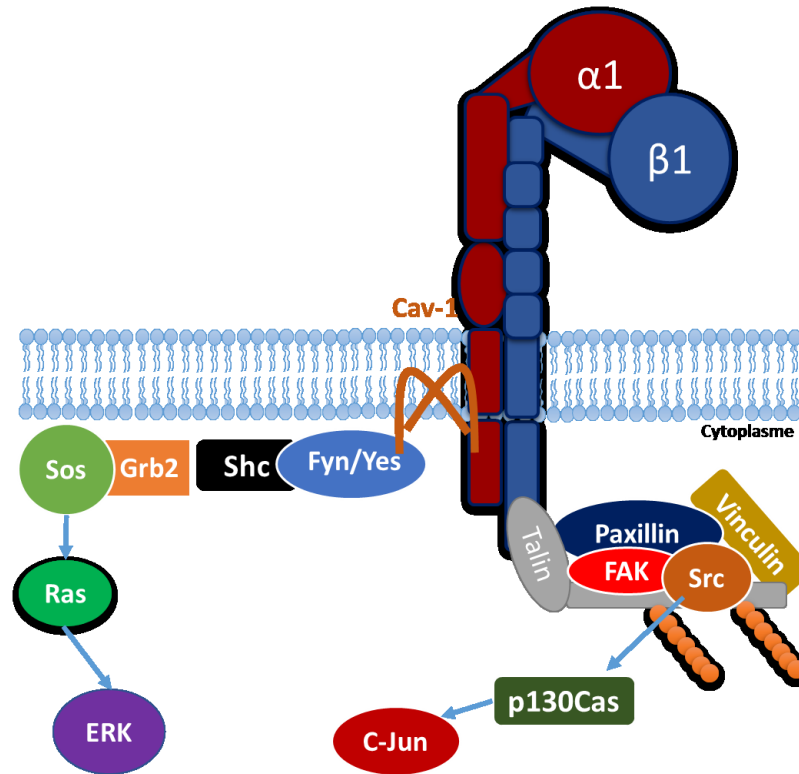


Figure 6. Implication de la sous-unité $\alpha 1$ dans la signalisation induite par l'intégrine $\alpha 1\beta 1$. Suite à sa liaison à son ligand, c'est la sous-unité $\beta 1$ qui fait la liaison au cytosquelette d'actine par le réseau taline/FAK/vinculine/paxilline, et recrute Src qui joue un rôle dans la survie des cellules épithéliales intestinales. L'intégrine $\alpha 1\beta 1$ par l'intermédiaire du domaine transmembranaire de la sous-unité $\alpha 1$ recrute la cavéoline-1. Celle-ci se lie à Fyn (ou Yes) et Shc qui phosphoryle Grb2. Grb2 active Sos ce qui active par la suite la voie proliférative RAS/MEK-ERK. La sous-unité $\beta 1$ peut activer cette voie via FAK/Grb2/Sos (non représenté sur la figure).

1.8. La migration cellulaire :

La migration cellulaire est un évènement fondamental pour le déplacement de différents types cellulaires pour assurer des fonctions particulières comme au cours du développement embryonnaire, la cicatrisation, la vascularisation et l'inflammation, mais aussi au cours de la pathologie tumorale incluant la croissance tumorale, la néoangiogenèse et la formation de métastases. C'est un processus complexe et finement régulé faisant intervenir différents facteurs qui assurent une parfaite coordination entre des signaux intracellulaires et extracellulaires et qui résultent en un mouvement de la cellule grâce à son interaction avec les éléments de la matrice extracellulaire. Un cycle migratoire peut être divisé en plusieurs étapes : la polarisation de la cellule vers un facteur chimioattractant; la protrusion de la membrane sous forme de lamellipodes dans le sens du front de migration et l'adhésion à la matrice; détachement des adhésions à l'arrière de la cellule et la rétraction du corps cellulaire (figure 7) (Vicente-Manzanares et al., 2005). Le processus de migration est déclenché par la polymérisation de l'actine qui force la protrusion de la membrane cytoplasmique et forme ainsi des lamellipodes et filipodes. Il y a ensuite recrutement et agrégation des intégrines ($\beta 1$) qui vont s'associer à l'actine par plusieurs protéines de liaison dont la taline, vinculine, paxilline et α -actinine, et recrutent des protéines adaptatrices comme FAK (*focal adhesion kinase*) et Src (*Rous sarcoma oncogene cellular homolog*) qui vont induire différentes signalisations dont l'activation de GTPases de la famille Rho (Rac, Cdc42 et Rho) et la phosphorylation de MLCK (*Myosin light-chain kinase*), ce qui résulte en la formation de nouvelles fibres de stress et la contraction des filaments d'actine (Zaidel-Bar et al., 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005; Vicente-Manzanares et al., 2009). Du côté postérieur, le détachement des adhésions cellulaires se fait par un mécanisme impliquant le calcium qui diffuse à ce niveau et conduit à l'augmentation de la production d'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique). Ce dernier active la PKA (Protéine kinase A), qui phosphoryle RhoA et diminue son activité. Cet effet provoque la perte des fibres de stress et des adhésions focales et le détachement des liens avec la matrice, ce qui permet à la cellule d'avancer. Durant cet évènement les intégrines sont internalisées et peuvent être

dégradées ou recyclées vers le front de migration par un transport vésiculaire impliquant les protéines Rab21 et les caveolae (Shin et al., 2012; Onodera et al., 2013).

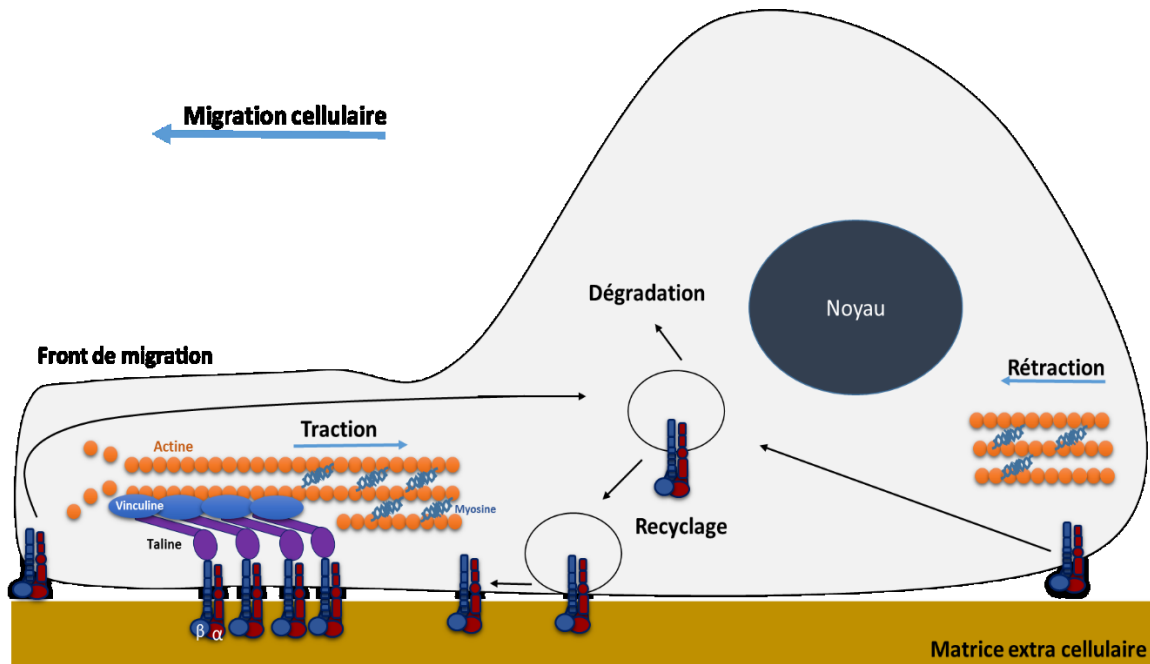


Figure 7. Représentation schématique de l'implication des intégrines dans la migration cellulaire. Dès que la cellule détermine la direction de son mouvement, c'est la polymérisation de l'actine qui est responsable de la formation de protrusions de la membrane cellulaire sous forme de lamellipodes ou de filipodes. Dans ces structures les filaments d'actines vont être connectés aux intégrines par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme la taline et la vinculine. La liaison des intégrines au substrat réalise des points d'adhésions focales qui serviront comme des points d'appuis lors du mouvement du corps cellulaire. Ce mouvement est amorcé par la contraction des fibres d'actine faisant intervenir le complexe actine-myosine. Les intégrines sont ensuite recyclées, via le transport vésiculaire pour former de nouvelles adhésions ou être acheminées vers la dégradation. L'étape finale est le mouvement du corps et la partie arrière de la cellule. Il y a rupture des adhésions à ce niveau et le déplacement est provoqué par le glissement des myosines sur les filaments d'actine situés dans le corps de la cellule et à l'arrière provoquant sa rétraction.

2. Problématique, hypothèse et objectifs :

Le cancer colorectal demeure malheureusement l'un des cancers les plus fréquents et mortels au Canada et dans le monde. Pour un diagnostic plus précoce et un traitement plus efficace, il est donc impératif de mieux comprendre ce cancer à travers l'identification des facteurs qui peuvent intervenir dans son développement et sa progression. Durant ces événements, les cellules cancéreuses subissent des mutations oncogéniques et des changements d'expression de certaines molécules importantes pour leur prolifération et leur survie, incluant les récepteurs membranaires comme les intégrines. Dans l'intestin grêle et le côlon normal de l'adulte, l'intégrine $\alpha1\beta1$ est exprimée uniquement par les cellules de la zone proliférative de la crypte alors qu'elle est absente dans les cellules différenciées. Un des buts de mon projet est d'analyser l'expression de la sous-unité $\alpha1$ dans le cancer colorectal. Parmi les rares publications qui ont porté sur la régulation de l'expression du gène *ITGA1* qui code pour la sous-unité $\alpha1$, une seule avait montré que ce gène est réprimé par méthylation de l'ADN des cellules hématopoïétiques, alors que N-MYC pourrait moduler son expression dans les neuroblasomes. Dans mon étude nous allons identifier les mécanismes ainsi que les possibles facteurs de transcription qui peuvent réguler l'expression de la sous-unité $\alpha1$ dans le contexte du cancer colorectal. Du point de vue fonctionnel, $\alpha1\beta1$ supporte la prolifération, la survie et l'invasion des cellules tumorales mammaires et pulmonaires dans le modèle murin. Des études ont démontré que des fonctions prolifératives, de survie et de migration sont attribuées à la sous-unité $\alpha1$. D'autres études ont montré que l'intégrine $\alpha1\beta1$, via le recrutement de la cavéoline 1 par la sous-unité $\alpha1$, régule positivement la voie proliférative RAS/MEK/ERK. Le fait que cette intégrine est présente uniquement dans la crypte suggère qu'elle peut avoir un rôle pro-prolifératif dans le contexte du cancer colorectal, dans lequel l'expression de cette sous-unité n'est pas connue. Nous postulons donc que l'intégrine $\alpha1\beta1$ est exprimée dans le cancer colorectal et qu'elle a un rôle favorisant dans la progression de ce cancer.

Pour valider mon hypothèse de recherche je me suis fixé trois objectifs :

- 1- Analyser le profil d'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les cellules tumorales colorectales et quantifier son expression dans les tissus d'adénocarcinomes par rapport à son expression dans le tissu colique normal;
- 2- Analyser le promoteur du gène *ITGA1* qui code pour la sous-unité $\alpha 1$ et identifier les mécanismes et/ou les facteurs de transcription qui pourraient intervenir dans la régulation de l'expression du gène *ITGA1* dans le CCR;
- 3- Déterminer le rôle de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans la progression de l'adénocarcinome colorectal, en abolissant l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ et en mesurant son impact sur la prolifération, la survie et la migration des cellules adénocarcinomateuses colorectales ainsi que son effet sur leur potentiel tumorigénique *in vivo*.

3. Matériels et méthodes :

3.1. Patients, tissus et TMA (*tissue micro array*) :

- Patients :

Les échantillons de 65 tumeurs colorectales ainsi que les marges de résection respectives (marge de résection située au moins à 10 cm de la tumeur primaire) ont été obtenus après chirurgie de patients atteints de cancer colorectal n'ayant subi aucun traitement néo adjuvant préalable (sans chimiothérapie et sans radiothérapie). Les tissus ont été obtenus après un consentement éclairé et écrits conformément à un protocole approuvé par le comité d'éthique du centre hospitalier universitaire de Sherbrooke. Le diagnostic histopathologique a été confirmé au département de pathologie et les tumeurs ont été groupées selon la classification TNM de l'OMS.

- Tissus :

Rapidement après l'opération chirurgicale et avant la fixation de la pièce opératoire, pour chaque patient, des échantillons de la tumeur et de la marge de résection ont été prélevés et ont été directement enrobés dans l'OCT (*optimal cutting temperature*, VWR, Ville Mont-Royal, Québec) puis congelés à -80°C. Ces prélèvements ont été utilisés pour les études d'immunofluorescence (IF). À partir des tissus non fixés, l'ARN (acide ribonuclease) a été extrait utilisant la trousse *Totally RNA kit* en suivant la procédure du manufacturier (Invitrogen, Burlington, ON). La transcription inverse de l'ARN a été réalisée en utilisant la trousse *AMV reverse transcriptase* (Roche, Laval, QC). D'autres échantillons ont été fixés dans une solution de 0,1 M PBS [*phosphate-buffered saline*; NaCl 137mM (Fisher), KCl 2,7mM (Avantor, Center Valley, PA), Na₂HPO₄ 10mM (Fisher), KH₂PO₄ 1,8mM (Sigma)] contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA, Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON), durant la nuit à 4°C. Par la suite, les échantillons ont été déshydratés dans des bains à concentration d'alcool croissante, inclus en paraffine puis des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées puis colorées à l'hématoxyline (EMD, Chemicals, San Diego, CA) et à l'éosine (Fisher) pour l'étude morphologique. À partir des tissus enrobés de paraffine, des coupes de 10 µm ont été réalisées pour l'extraction de l'ADN génomique utilisant la trousse *Isolation Kit for Cells and Tissues* selon les directives du manufacturier

(Qiagen, Valencia, CA). L'ADN extrait a été amplifié par PCR (*polymerase chain reaction*) et la présence de mutations dans les tumeurs a été détectée par séquençage direct, réalisé par la Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (Laval, Québec, QC). La caractérisation moléculaire a inclus la mutation oncogénique de *KRAS* (Ki-ras; codons 12, 13, et 61) et de *BRAF* (V600E), la mutation activatrice du gène *CTNNB1* (exon3), la mutation de *P53* (exons 5 et 8) (Conlin et al., 2005) ainsi que l'instabilité des microsatellites (MSI panel marker; NCI, Bethesda, MD).

- Construction du TMA

Préalablement à la confection du TMA, tous les tissus ont été morphologiquement analysés dans le but d'identifier les zones à prélever. La confection du TMA a été réalisée comme décrit précédemment (Chen et Zhou 2005; Boudjadi et al., 2013). À partir du bloc de paraffine correspondant à chaque tissu, en utilisant un punch de biopsie dermatologique de 2 mm de diamètre (Miltex Inc York, PA), un prélèvement sous forme de carotte est effectué au niveau de la zone marquée et transféré par la suite dans un moule préalablement couvert d'un double adhésif, évitant aux carottes de tomber. Ces carottes sont ensuite recouvertes de paraffine chaude remplissant tout le moule et permettant la fusion avec la paraffine des carottes et ainsi créer un nouveau bloc après incubation d'environ une heure à 4°C. À partir de ce nouveau bloc, des coupes de 4 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un microtome Spencer 820 (American Optical Company, NY). Les coupes étalées sur lame de verre ont été conservées à la température de la pièce (TP). Une coloration à l'hématoxyline (EMD) et à l'éosine (Fisher) a été réalisée pour confirmer la présence des zones tissulaires prélevées.

3.2. Immunohistochimie et définition des scores d'expression :

Au départ les coupes tissulaires montées sur lame de verre ont été déparaffinées dans deux bains successifs de xylène (EMD Chemicals, San Diego, CA) pendant 5 minutes, puis réhydratées deux fois 3 minutes dans des bains d'éthanol 100% (Les Alcools de Commerce, Brampton, ON) puis dans l'eau distillée pendant 5 minutes. Par la suite,

l'étape de la réactivation antigénique a été réalisée en utilisant la méthode de révélation par la chaleur. Les lames ont été plongées dans le tampon citrate 10 mM pH 6.0 (Fisher), pour la détection des protéines $\alpha 1$ et CD-31, et dans le tampon Tris-EDTA-Tween [Tris-HCl pH8 10mM (Wisent, St-Bruno, Québec, QC), EDTA 1mM pH8 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), Tween-20 0.05% (Fisher)] pour la détection de la protéine MYC, comme recommandé par la compagnie. Dans les deux cas, les lames mises dans les tampons ont été chauffées au four micro-onde (HOTPOINT, General Electric, Mississauga, ON) pendant 20 minutes pour amener le tampon à ébullition. Après un refroidissement dans l'eau coulante pendant 15 minutes, les lames sont ensuite immergées dans l' H_2O_2 (Fisher) 0,2 % méthanol (Fisher) dans le but de bloquer les peroxydases endogènes.

Par la suite, les tissus ont été incubés dans une solution de streptavidine (Vector Laboratories, Burlingame, CA) pendant 15 minutes suivi, après un lavage au PBS deux fois 5 minutes, d'un blocage par la biotine (Vector Laboratories) pendant 15 minutes. Pour la détection de la protéine $\alpha 1$, un blocage des sites antigéniques non spécifiques a été effectué pendant 30 minutes avec un sérum comportant du PBS avec 0.1% BSA (Sigma), 0.2% Triton X-100 (ICN Biochemicals, Aurora, OH), 0.1% *donkey serum* (Santa Cruz, Dallas, TX) et 0.1% *goat serum* (Santa Cruz). Pour MYC, les sites non spécifiques ont été bloqués par une solution de blotto 5% [PBS, 5% (w/v) lait en poudre Carnation (Makham, ON)] pendant 30 minutes. Directement après le blocage, les lames ont été incubées toute la nuit à 4°C dans une chambre humide avec la même solution de blocage comportant soit les anticorps anti- $\alpha 1$ (5 μ g/ml, AF5676, R&D Systems, Minneapolis, MN), les anticorps anti-MYC (1/100, clone Y69, ab32072, Abcam) ou les anticorps anti-CD31 (5 μ g/ml, P2B1, Wayner, E.A. / Vercellotti, G. DSHB).

Le lendemain, les lames sont lavées dans du PBS deux fois 5 minutes sous agitation puis incubées pendant une heure à TP dans du blotto 5% comportant les anticorps secondaires biotinylés anti-chèvre 1:1000 (Millipore, Billerica, MA, USA) pour la détection de la sous-unité $\alpha 1$ ou les anticorps biotinylés anti-lapin 1:1000 (GE Healthcare, Ipswich, MA, USA) pour la protéine MYC, ou les anticorps biotinylés anti-souris 5 μ g/ml (401213,

Calbiochem, Canada) pour la détection du CD-31. Après lavage au PBS, 5 minutes à deux reprises, les lames sont incubées dans une chambre humide 1 heure à TP avec de la streptavidine-HRP (Vector Laboratories) diluée 1:1000 dans du PBS. Après rinçage des lames 2 fois 5 minutes avec du PBS, les tissus sont mis en réaction avec le complexe DAB (Vector Laboratories) jusqu'à coloration brune puis rincés 5 minutes dans l'eau distillée. Une contre coloration par l'hématoxyline de Harris (EMD) est réalisée dans le but de mettre en évidence l'architecture des tissus. Les lames sont incubées 2 minutes dans l'hématoxyline (EMD) et ensuite rapidement rincées pendant 2 minutes dans l'eau courante, puis plongées 4 fois dans une solution d'éthanol 100% (Fisher) contenant du HCl 1 N puis à nouveau rincées dans l'eau 2 minutes et ensuite plongées 4 fois dans le carbonate de lithium 2% (Fisher). Les tissus sont ensuite déshydratés en plongeant les lames 4 fois dans l'éthanol 100%. Les lames sont ensuite plongées dans le xylène à deux reprises pendant une minute. Le montage est effectué avec du medium Cytoseal (VWR) et des lamelles en verre 24x60 mm (VWR).

L'étude immunohistochimique a été effectuée utilisant le microscope optique Reichert Polyvar 2 (Leica, Saint-Laurent, QC, Canada) équipé d'une caméra couleur (DFC300FX camera; Leica). La capture des photos a été réalisée en utilisant le logiciel Photoshop (Adobe, San Jose, CA). L'analyse a porté sur l'observation de l'intensité du marquage membranaire pour $\alpha 1$ et nucléaire pour MYC. Pour comparer l'expression des deux protéines dans le cancer par rapport au tissu non tumoral, et en fonction du stade du CCR, une échelle d'intensité de 0 à 2 a été utilisée pour classer les niveaux d'expression. Le score (0) est attribué aux tumeurs où l'expression est négative/faible ou comparable à celle de l'épithélium de surface, le score (1) est attribué quand l'expression est modérée et le score (2) quand l'expression est forte ou d'intensité supérieure à celle de la crypte. Ces valeurs ont été comparées par le test de McNemar-Bowker de façon appariée entre le tissu sain et le tissu cancéreux pour chaque patient. Pour la corrélation entre l'expression des protéines $\alpha 1$ et MYC dans le CCR, le test du Kappa pondéré (quadratique) avec mesure du pourcentage d'accord, a été utilisé pour apprécier la concordance des scores d'expression.

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SPSS, version 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) et le logiciel StatXact, version 6 (Cytel Software Corporation).

3.3. Immunofluorescence :

Dans le but de déterminer le profil d'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans le CCR, des coupes congelées de 3 μm d'épaisseur ont été effectuées à partir d'échantillons de CCR de la banque des tissus. La procédure a été réalisée selon le protocole établi au laboratoire (Dydenborg et al., 2009; Khalfaoui et al., 2013). Les coupes ont été préalablement fixées dans l'éthanol pendant 20 minutes à -20°C et après deux lavages au PBS froid, un blocage des sites non spécifiques a été réalisé dans une solution de blotto 10% pendant 30 minutes. Les sections ont été ensuite hybridées avec une solution de blotto 10% comportant les anticorps primaires anti- $\alpha 1$ dilués 1/10 (TS2/7 monoclonal, Endogen, Woburn, MA) et anti laminines dilués 1/1000 (Serotec, Raleigh, NC), pendant 2 heures à TP. Après trois lavages au PBS froid, les tissus ont été ensuite incubés pendant une heure avec les anticorps secondaires anti souris conjugués au 488-AlexaFluor (Molecular Probe, Burlington, ON) et anti lapin conjugués au 594-AlexaFluor (Molecular Probe). Après deux lavages au PBS froid, les noyaux ont été colorés au PBS-DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole, 10 ng/ml, pH 7.4) pendant 2 minutes suivi d'un deuxième lavage au PBS. Après montage dans une solution de glycérol (PBS (9:1) 0.1% paraphenylenediamine) les tissus ont été observés avec le microscope Leica (DMRXA microscope, Leica) équipé de la caméra RTE/CCD Y/Hz-I300 (Leica) et les images obtenues ont été montées utilisant le logiciel *Metamorph Imaging System* (Universal Imaging, West Chester, PA).

3.4. Culture cellulaire :

Les lignées cellulaires tumorales coliques HT29, T84, SW480, SW620, DLD1, ainsi que la lignée HEK293T (issue de cellules embryonnaires rénales immortalisées) ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). La lignée Caco-2/15 est un sous-clone de la lignée Caco-2 qui a été bien caractérisé dans notre laboratoire et ailleurs (Chantret et al., 1988; Beaulieu et al., 1989; Vachon et Beaulieu 1992). Les cellules ont été

gardées à -80°C ou dans l'azote liquide pour le stockage de longue durée. Toutes les cellules ont été mises en culture dans le milieu *Dulbecco's Modification Eagle's Medium* (DMEM) (Wisent) complémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec, QC), 2 mM GlutaMAX (Gibco) et 10 mM Hepes (Wisent), excepté la lignée T84 dont les cellules ont été maintenues dans le milieu de culture *Dulbecco's modified Eagle's medium/F12* (Life Technologies) comportant 5% de FBS, 2.5 mM GlutaMAX, 15 mM Hepes et 0.5 mM de sodium pyruvate (Basora et al., 1998; Dydensborg et al., 2009; Groulx et al., 2014). Toutes les cellules ont été maintenues à 37°C dans un incubateur à atmosphère humidifiée comportant 5% de CO₂. Des tests de vérification de la contamination par les mycoplasmes ont été fréquemment réalisés utilisant la trousse *MycoSensor* (Agilent, Mississauga, ON). La lignée HCT116 a été traitée avec le 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA, Sigma) pendant 7 jours avec un changement quotidien du milieu de culture. Les lignées T84, HT29 et SW480 ont été traitées avec l'inhibiteur de MYC (MYCi), le 10058-F4 (Sigma), aux concentrations et aux durées indiquées pour chaque condition.

3.5. Extraction des ARNs :

L'extraction a été faite comme décrit précédemment (Boudjadi et al., 2015). Après avoir retiré le milieu de culture, les Pétris comportant les cellules sont rincés à trois reprises utilisant le PBS froid. Les cellules sont ensuite récoltées dans 3 ml de RiboZol (Amresco, OH, USA). Du chloroforme (Sigma) est ajouté à raison de 200 µl pour chaque millilitre de RiboZol. Après un mélange rapide, les échantillons sont incubés à TP pendant 10 minutes puis centrifugés durant 15 minutes à 10 000 rpm. La phase aqueuse, contenant les ARNs, est ensuite transférée dans un autre tube. Pour la précipitation des ARNs, de l'isopropanol (Sigma) est ajouté (500 µl pour 1000 µl de RiboZol) suivi d'une légère agitation par inversion des tubes et une incubation à TP de 10 minutes. Une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes permet de récupérer l'ARN sous forme de culot. Ce dernier est d'abord rincé avec de l'éthanol 70%, séché pendant 10 minutes, puis suspendu dans le *RNA-Secure* (Fisher) et chauffé à 60°C pendant 20 minutes, dans le but de désactiver les RNase. Les échantillons sont ensuite gardés à -80°C jusqu'au dosage. Ce dernier a été

réalisé en utilisant un spectrophotomètre (SpectraMax plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) avec une lecture aux longueurs d'ondes 260nm et 280nm.

3.6. Transcription inverse (Synthèse de l'ADN complémentaire) :

A partir de l'ARN extrait des cellules, un ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé par une réaction utilisant une transcriptase inverse. Cette réaction a été faite utilisant la trousse *OmniscriptX® Reverse transcriptase* (Qiagen, Toronto, ON, Canada) suivant la procédure recommandée par le manufacturier et comme effectuée précédemment (Benoit et al., 2010). Pour chaque échantillon, on prépare une solution comportant 2 µl de tampon RT, 2 µl de dNTP (0.5 mM pour chaque dNTP), 2 µl d'amorces Oligo-dt (10 µM), 1 µl d'amorces aléatoires (10 µM), 1 µl d'inhibiteurs d'ARNase, 1 µl de transcriptase inverse *Omniscript* (4UI). Le tout est mélangé pendant quelques secondes et gardé toujours sur glace. Par la suite, on ajoute aux tubes 2 µg d'ARN et le volume final est complété à 20 µl par de l'eau, sans DNase et sans ARNase, suivi d'un autre mélange. Les échantillons sont traités à la DNase (Qiagen) pendant 10 minutes à TP puis celle-ci est désactivée avec un ajout de l'EDTA et une incubation à 65°C pendant 15 minutes. Pour la réaction de transcription inverse, les échantillons sont incubés à 37°C pendant 60 minutes. L'ADNc néo synthétisé est conservé à -20°C.

3.7. Réaction par polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (qPCR) :

Il s'agit d'une technique permettant la mesure, à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADNc total ou d'amplicon utilisant un marqueur fluorescent. Chaque tube à PCR comporte 12 µl de *Syber Green* (Agilent), 1 µl de l'amorce sens, 1 µl de l'amorce anti-sens, 2 µl de l'ADNc (correspond à 10 ng d'ARN) à amplifier et le volume est complété à 20 µl par de l'eau sans ARNase et sans DNase (Wisent). La première étape correspond au chauffage à 95°C pendant 10 minutes dans le but de déshybrider les doubles brins d'ADN, d'activer les polymérases et d'homogénéiser le milieu réactionnel par une agitation thermique. La deuxième étape comprend en général 40 cycles. Chaque cycle comporte une première phase de dénaturation de l'ADN (95°C pendant 30 secondes), une deuxième

phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (55°C pendant 1 minute) et une troisième phase d'élongation (72°C pendant une minute). La troisième étape est un cycle de trois phases (95°C une minute, 55°C 30 secondes et 95°C 30 secondes) permettant de réaliser des courbes de dissociation, utiles pour déterminer la spécificité des amorces. Celles-ci sont considérées comme spécifiques d'un amplicon si l'on obtient une seule courbe de dissociation. Cela confirme aussi l'absence de dimères d'amorces. La cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible. Les qPCR ont été réalisées avec le thermocycleur Mx3000P de Stratagene (Agilent technologies, Mississauga, ON, Canada).

L'efficacité des amorces est vérifiée en réalisant une courbe standard à partir d'un ADNc d'un échantillon n'ayant subi aucun traitement. Une réaction de qPCR est alors réalisée avec des dilutions croissantes de cet ADNc (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 et 1:32) et les amorces de chaque gène ciblé. Une bonne efficacité est comprise entre 95 et 105 %. La quantification d'un gène de référence a été faite pour normaliser les quantités d'ADNc dans les différents échantillons. Pour les lignées cellulaires, nous avons choisi le gène *RPLP0* (*ribosomal protein, large, P0*) qui ne devrait pas subir de modification suite aux différents traitements effectués sur les cellules, alors que le gène *B2M* (Beta-2 microglobuline) a été choisi comme normalisateur pour les qPCR faites avec de l'ADNc provenant des tissus (Dydenborg et al., 2006). Après amplification des différents gènes d'intérêt, ainsi que les gènes de référence, la quantification de l'ADN était effectuée selon la méthode de calcul suivante (Pfaffl 2001) :

$$\text{Ration} = E_{(\text{gène cible})}^{\Delta CT \text{ gène cible (contrôle-traité)}} / E_{(\text{gène contrôle})}^{\Delta CT \text{ gène de référence (contrôle-traité)}}$$

E est l'efficacité de l'amplification (souvent près de 2) et où le CT est le nombre de cycle pour que l'amplification soit exponentielle.

Tableau V. Amorces utilisées pour le qPCR en temps réel.

Nom	Amorce
<i>ITGA1</i>	Sens 5'- catcaggtggggatggtaag -3'
	Anti-sens 5'-tggtcaaaaattcatggtca -3'
<i>B2M</i>	Sens 5'- gtgctcgcgctactctctc -3'
	Anti-sens 5'- gtcaacttcaatgtcggat -3'
<i>RPLP0</i>	Sens 5'- gcaatgttgccagtgtctg -3'
	Anti-sens 5'- gccttgaccttttcagcaa -3'
<i>MYC</i>	Sens 5'- cctaccctctcaacgacagc -3'
	Anti-sens 5'- ctctgaccttttgccaggag -3'

3.8. Réaction par polymérisation en chaîne standard (PCR) :

Une réaction de polymérisation en chaîne est réalisée à partir de l'ADNc qui a été synthétisé à partir de l'ARN extrait des cellules suivant un protocole établi au laboratoire (Dydenborg et al., 2006). Chaque tube de PCR comporte 1 µl d'ADNc, 2,5 µl de tampon d'amplification 10X (100mM Tris-HCl (Invitrogen) pH 8, 500 mM KCl (Fisher), 15 mM MgCl₂), 1 µl de dNTP (GE Healthcare), 1 µl de chaque amorce et 1 µl de Taq polymérase (Roche Diagnostics). Le volume est complété à 25 µl par l'eau PCR (sans RNase et sans DNase). La PCR standard est une réaction en point finale, c'est à dire que le produit de cette réaction n'est visualisé qu'à la fin de la réaction par une migration sur gel d'agarose (EMD) à 100 volts (Power Pac Universal, model 200/2.0 power supply, Bio-Rad) pendant 25 minutes. La lecture est immédiatement faite sous lumière ultraviolette utilisant un appareil à chambre noir (MBI Lab Equipments, Montréal, Canada).

3.9. Extraction des protéines :

Les Pétris sortis de l'incubateur sont directement vidés du milieu de culture et sont rincés à trois reprises par du PBS froid. Rapidement, 1 ml de tampon Laemmli [62,5 mM Tris-HCl pH 6.8 (Invitrogen), 2.3% SDS (Invitrogen), 10% glycérol (Fisher), 0.005% bleu de bromophenol (VWR), 4% β-mercaptoethanol (Sigma)] est ajouté à chaque Pétri, et le tout est récupéré à l'aide d'un grattoir dans des tubes de 1,5 ml. Après un mélange rapide, les cellules sont soniquées 15 à 20 fois à l'aide d'un sonicateur (Branson Sonifer 250, MA)

dans le but de fragmenter l'ADN génomique. Le lysat est ensuite chauffé à 95°C pendant 5 minutes dans le but de dénaturer les protéines, suivi d'une centrifugation de 20 minutes à 13000 rpm. Le culot de membranes et d'ADN est laissé dans le tube et seul le surnageant comportant les protéines est récupéré dans de nouveaux tubes qui sont identifiés et gardés à -80°C.

3.10. Dosage des protéines :

La concentration en protéines des échantillons a été dosée utilisant la trousse RC DC Protein Assay (Bio-Rad) suivant le protocole du laboratoire (Ni et al., 2005) et recommandé par le fabricant. Tout d'abord une solution A' est préparée à partir du réactif S (#500-0115, Bio-Rad) et du réactif A (# 500-0113, Bio-Rad) à raison de 5 µl du premier pour 250 µl du deuxième réactif. Par la suite 5 à 10 µl sont prélevés à partir des échantillons à doser et sont suspendus dans 125 µl de la solution I (# 500-0119). Le tout est mélangé, incubé une minute, suivi d'un bref mélange et de l'ajout de 125 µl du réactif II (# 500-0119) dans le but de faire une précipitation des échantillons. Ceux-ci sont ensuite centrifugés à 13000 rpm pendant 3 minutes. Ensuite le surnageant est jeté et les culots sont laissés sécher de 5 à 10 minutes. Ces culots sont alors resuspendus dans 127 µl de la solution A', mélangés jusqu'à dissolution totale des culots puis incubés pendant 5 minutes à TP. Après un autre mélange, 1ml du tampon de réaction B (#500-0114, Bio-Rad) est ajouté aux échantillons suivi d'une incubation de 15 minutes à TP. Le tout est encore une fois mélangé puis dosé par un spectrophotomètre (Molecular Devices) dans la longueur d'onde 755nm. Dans le but d'analyser la sensibilité et l'efficacité du dosage, une courbe standard est réalisée par le dosage d'une gamme d'étalon de BSA (Wisent) avec des concentrations croissantes allant de 0 à 0,8 mg/ml.

3.11. Immunobuvardage :

L'immunobuvardage permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire suite à leur migration dans un gel d'acrylamide. Le pourcentage du gel d'acrylamide est choisi selon le poids moléculaire des protéines à détecter. Pour exemple, le gel d'acrylamide

10% comporte du Tris-HCl 375 mM pH 8.8 (Invitrogen), 33% d'une solution d'acrylamide/Bis 30% (Bio-Rad), 0.1% de SDS (Fisher), 0.1% de persulfate d'ammonium (Bio-Rad) et 0.04% de TEMED (Sigma). L'immunobuvardage a été réalisé suivant la procédure établit au laboratoire (Benoit et al., 2010; Gagne et al., 2010; Boudjadi et al., 2015) . Le montage réalisé comporte le gel de migration surmonté d'un gel de concentration contenant 5% d'acrylamide (Bio-Rad), 125 mM de Tris-HCl pH 6.8 (Invitrogen), 0,1% SDS (Fisher), 0,1% de persulfate d'ammonium (Bio-Rad) et 0.01% de TEMED (Sigma). Le gel de concentration comporte des puits dans lesquels une quantité de protéines (50 à 100 µg) suspendue dans le tampon Laemmli est chargée. La migration est effectuée à un ampérage de 20 mA par gel de 1,5 mm d'épaisseur (PowerPac Universal, Bio-Rad) pendant environ 1h30 dans un tampon de migration [25 mM Tris (Wisent), 190 mM glycine (Wisent), 0.1% SDS (Fisher)]. Par la suite, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) à 250 mA pendant 1h30 dans un bain comportant un tampon de transfert [(25 mM Tris (Wisent), 190 mM glycine (Roche Diagnostics), 20% méthanol (EMD)]. La vérification de l'efficacité du transfert est réalisée par coloration de la membrane au rouge Ponceau 0.2% (Sigma). La membrane est alors découpée aux endroits comportant les bandes de protéines à analyser. Elle est ensuite décolorée dans l'eau puis incubée sous agitation pour blocage des sites non spécifiques pendant une heure avec une solution de blotto 5% [PBS, 0.1% Tween-20 (Fisher) 5% (w/v) de lait en poudre Carnation, (Makham, ON)]. La membrane est ensuite incubée, sous agitation, pendant la nuit dans une solution de blotto 5% comportant les anticorps primaires (voir tableau VI). Le lendemain, la membrane est rincée 3 fois durant 10 minutes dans du PBST [PBS, 0.1% Tween-20 (Fisher)] puis incubée une heure dans du blotto 5% comportant les anticorps secondaires conjugués à une peroxydase HRP (*horse radish peroxidase*) (tableau VII). Un autre lavage au PBST est effectué à trois reprises pendant 10 minutes chacune. La révélation des protéines est effectuée utilisant la trousse *Immobilon* (Millipore), et par la suite la détection est réalisée par radiographie sur des films Biomax Light (Kodak, Toronto, ON, Canada). Si nécessaires les membranes sont décapées dans une solution comportant du Guanidine-HCl 6M (Fisher), NP40 0,2%

(Roche), β -mercaptoéthanol (Sigma) 0,1M et du Tris-H-Cl et 20 mM pH 7,5 (Wisent). Les membranes sont incubées dans cette solution durant 5 minutes à deux reprises. Elles sont ensuite rincées pendant 3 minutes à 4 reprises dans une solution de lavage comportant du Tris-HCl 10 mM pH 7,5 (Wisent), du NP40 0,05% et du NaCl. Les membranes sont ensuite bloquées dans le blotto puis incubées avec un autre anticorps primaire et la procédure qui va suivre sera identique à celle des membranes incubées pour la première fois.

Tableau VI. Liste des anticorps utilisés.

Référence de l'anticorps	Espèce	Protéine reconnue	Monoclonal/polyclonal
AF5676 (<i>R&D Systems</i>)	Chèvre	Sous-unité α 1	Polyclonal
TS2/7 (<i>Endogen</i>)	Souris	Sous-unité α 2	Monoclonal
Ab32072 (<i>Abcam</i>)	Lapin	MYC	Monoclonal
Ab133557 (<i>Abcam</i>)	Lapin	Sous-unité α 2	Monoclonal
Mab13 (<i>BD Biosciences</i>)	Rat	Sous-unité β 1	Monoclonal
Mab 1501 clone C4 (<i>Millipore</i>)	Souris	β Actine	Monoclonal
LN949 (<i>Serotec</i>)	Lapin	laminine 1	Monoclonal
P2B1 (<i>DSHB Hybridoma Product</i>)	souris	CD-31	Monoclonal
Sc20105 (<i>Santa Cruz Biotechnology</i>)	Lapin	Phospholipase A2	Polyclonal
HSI-14 (Beaulieu et al, 1989)	Souris	Sucrase Isomaltase	Monclonal

3.12. Transfections transitoires et essais luciférase :

Les transfections transitoires et les essais luciférase ont été effectués pour analyser l'effet des facteurs de transcription sur l'activité du promoteur du gène *ITGA1*, selon un protocole mis au point au laboratoire (Dydenborg et al., 2009; Groulx et al., 2014) .

Les cellules 293T pré-confluentes ont été trypsinisées (Wisent), puis réparties dans des plaques à 12 puits à raison de 50000 cellules par puits. Le lendemain, les constructions plasmidiques du gène *ITGA1*-Renilla (100ng/puit), MYC (100ng/puit), MAD (100ng/puit), TCF4 (100ng/puit), β -caténine (100ng/puit) et Plenti (100ng/puit) ont été transfectées selon chaque condition. Le vecteur comportant le rapporteur firefly-luciférase a été transfecté dans chaque puit (2 ng/puit) et a été utilisé comme control de la transfection. Tous les vecteurs ont été transfectés à l'aide de l'*Effectine* (Invitrogen), selon les directives

du manufacturier. Pour chaque puit, un premier mélange comportait les quantités nécessaires de construction à transfecter, en plus de 50 µl de tampon EC et 1,5 d'*enhancer*. Après un mélange et une incubation de 5 minutes l'*Effectine* est ajoutée à raison de 2 µl par puit, suivi d'une incubation de 10 minutes. Le volume est ensuite complété à 1ml avec du milieu de culture et le tout est ajouté dans le puits contenant les cellules, après aspiration de l'ancien milieu de culture.

Après une incubation de 48 heures à 37°C, les cellules ont été d'abord rincées avec du PBS froid, puis lysées dans 250 µl de tampon de lyse (Promega, Madison, WI, USA) pendant 15 minutes sous faible agitation à TP. La mesure de la luminescence a été faite utilisant les réactifs LARII et Stop and GLO, selon le protocole de la compagnie (Promega), et la lecture a été faite par un luminomètre (Orion Microplate luminometer, Berthold detection Systems, Huntsville, Alabama, USA).

3.13. Analyse bioinformatique du promoteur du gène *ITGA1* :

La recherche d'éléments de réponse sur le promoteur du gène *ITGA1* a été faite visuellement et à l'aide du logiciel MatInspector (<http://www.genomatix.de/en/index.html>).

3.14. Mutagenèse dirigée :

Dans le but de confirmer la fonctionnalité des éléments de réponse identifiés, une approche par mutation sélective de ces éléments a été utilisée (Boudjadi et al., 2013). La technique de mutagenèse dirigée permet donc d'induire des mutations ciblées (délétion, insertion ou substitution de nucléotides). Dans un premier temps, des amorces (sens et anti-sens) sont confectionnées de façon à comporter une séquence nucléotidique incluant une modification des nucléotides composant l'élément de réponse étudié, afin qu'il ne soit plus reconnaissable par le facteur de transcription correspondant (tableau VII). Ensuite, en utilisant la trousse *Geneart Site Directed Mutagenesis System* (Invitrogen), une réaction de PCR en point final (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, CA) est effectuée. Cette réaction comprend une étape de méthylation du plasmide

comportant le promoteur du gène *ITGA1* (pSGG, Switch gear genomics) suivie d'une étape d'amplification/mutagenèse utilisant la polymérase *AccuPrime™ Pfx* (Invitrogen) et les amorces sens et anti-sens confectionnées. Directement après la PCR, une réaction de recombinaison est effectuée à TP pendant 10 minutes et qui est ensuite stoppée par l'ajout d'1 µl d'EDTA 0,5 M, puis immédiatement suivie d'une transformation des bactéries. 2 µl du produit de recombinaison sont transférées dans les bactéries DH5α (One Shot® MAX Efficiency® DH5α™ –T1^R, Invitrogen) fraîchement décongelées (temps de décongélation de 7 minutes). Le tout est incubé 12 minutes sur glace puis 30 secondes dans un bain à 42°C puis encore 2 minutes sur glace, dans le but de faire introduire les plasmides à travers la paroi des bactéries. 250 µl de milieu de culture SOC (*Super Optimal Broth*, Invitrogen) sont alors ajoutés aux tubes avec les bactéries avant de les incuber une heure à 37°C sous agitation. Le produit de cette réaction est dilué 1:10 dans le milieu de culture SOC. À partir de ce milieu, 100 µl sont étalés sur un Pétri préchauffé comportant un milieu de culture LB-Agar (lysogeny broth, Roche) supplémenté d'ampicilline (Wisent) à 100 µg/ml, un antibiotique utilisé comme agent de sélection. Ces Pétris sont incubés à 37°C pendant 16 à 20 heures. 3 à 6 colonies formées sont prélevées des Pétris puis mises en culture dans 1 ml de milieu LB avec Ampicilline (100 µg/ml) pendant 16 heures à 37°C sous agitation. Ensuite, 200 µl sont gardées à 4°C et 800 µl sont prélevés pour extraction et purification de l'ADN en utilisant la trousse *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen). L'ADN est dosé utilisant un spectrophotomètre (SmartSpec™) puis envoyé pour séquençage à la plateforme de séquençage et de génotypage des génomes du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CRCHUL Québec, QC, Canada). Après validation des mutations effectuées, les 200 µl de bactéries gardés à 4°C sont mis en culture dans 100 ml de milieu LB avec ampicilline (100 µg/ml) pendant 16 à 20 heures sous agitation et à 37°C. L'ADN est alors extrait des bactéries utilisant la trousse *PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit* (Invitrogen) puis dosé au spectrophotomètre (SmartSpec™).

Tableau VII. Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.

Nom	Amorce
EBOX-S1	Sens 5'-cgacttcacggtgaatttgacaatccgcaggggatggaagg-3'
	Anti-sens 5'-ccttccatcccctgcggattgtccaaattcaccgtgaagtcg-3'
EBOX-S2	Sens 5'-caccctctcaatgaaagggggacctccctttaaggttgctt-3'
	Anti-sens 5'-aagcaaaccttaaaggagggtcccccttcattgagagggtg-3'

3.15. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) :

Dans le but de confirmer que le lien entre le facteur de transcription MYC et les éléments de réponse identifiés sur le promoteur du gène *ITGA1* existe au niveau de l'ADN génomique des cellules tumorales colorectales, l'immunoprécipitation de la chromatine a été utilisée comme décrit précédemment (Boudjadi et al., 2013). Les cellules amenées à sous confluence sont tout d'abord traitées avec du paraformaldéhyde 1% (Fisher Scientific), pendant 15 minutes sous faible agitation, dans le but de réticuler les protéines liées à l'ADN. La réaction est ensuite arrêtée par l'ajout de glycine 2,5 M (Roche Diagnostics), pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite rincées à deux reprises avec du PBS comportant des inhibiteurs de protéases (pastille Roche), puis récoltées dans du PBS froid comportant des inhibiteurs de protéases et transférées dans un tube de 2 ml (Progene). Après centrifugation de 4000 rpm à 4°C pendant 5 minutes, le culot cellulaire est ressuspendu dans 1 ml de tampon de lyse cellulaire [HEPES 1 M (Wisent), KCl 1 M (Fisher), NP40 (Roche Diagnostics)] supplémenté d'inhibiteurs de protéases, avec une faible agitation pendant 20 minutes à 4°C. Après une brève centrifugation à 2000 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est jeté. Un lavage du culot est effectué à deux reprises dans du PBS froid supplémenté d'inhibiteurs de protéases. Après centrifugation à 2000 rpm à 4°C le surnageant est retiré. Le culot est ressuspendu dans un tampon de lyse nucléaire [Tris-HCl pH 8 (Invitrogen), EDTA 0,5 M pH 8 (Fisher), SDS (Invitrogen) 10%, H₂O] contenant des inhibiteurs de protéases et mis sous faible agitation pendant 20 minutes à 4°C. Le lysat est ensuite soniqué dans le but de morceler l'ADN en fragments de 500 à 1000 paires de bases (sonicateur : Branson Sonifer 250) selon des conditions optimisées pour la lignée cellulaire HT29 (5 sonications de 10 secondes espacées d'une incubation

sur glace de 30 secondes). Le produit est alors centrifugé à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant l'ADN fragmenté est divisé en 3 fractions de 200 µl correspondant aux conditions de précipitation. A : avec anticorps d'intérêt (MYC), B : anticorps anti ARN-pol II et C : avec anticorps contrôle de souris (IgG). Chaque fraction est diluée en ajoutant 1800 µl de tampon de dilution [SDS 10%, Triton 100x (ICN Biochemicals), EDTA 0,5 M pH 8, Tris HCl 1 M pH 8 (Invitrogen), NaCl 5 M, H₂O] supplémenté d'inhibiteurs de protéases. Dans le but d'éliminer les impuretés, une étape de (*pre-clear*) a été réalisée et qui consiste à incuber les échantillons avec des billes d'agarose sous agitation, pendant une heure à 4°C. Ensuite, 1% du volume total est prélevé des tubes et gardé à -80°C. Cet échantillon servira comme ADN total de chargement (input). L'anticorps d'intérêt anti-c-myc (Abcam), anti POLII et anti-IgG (Upstate) sont ensuite ajoutés respectivement aux tubes A, B et C à la concentration optimale de 1% du volume total. Les trois tubes A, B et C sont incubés toute la nuit sous agitation à 4°C. Le lendemain, 80 µl de *protein A agarose/salmon sperm* DNA (Upstate) sont ajoutés à chaque tube afin de récolter le complexe anticorps-protéine-ADN, et les tubes sont incubés 1 heure sous agitation à 4°C. Les billes d'agarose sont culotées par centrifugation à 6000 rpm pendant 3 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite doucement retiré. Une série de lavage est effectuée avec plusieurs tampons. Pour chaque tampon le lavage est répété à deux reprises. 1 ml du premier tampon TSE1 [SDS 10%, Triton X-100, EDTA 0,5 M pH 8, Tris-HCl pH 8, 3% NaCl 5 M] est ajouté aux tubes, suivi d'une incubation de 5 minutes sous agitation à 4°C, puis centrifugation à 3000 rpm à 4°C et le surnageant est doucement enlevé. Les autres lavages sont fait comme pour le premier avec les tampons TSE2 [SDS 10%, Triton X-100, EDTA 0,5 M pH 8, Tris HCl pH 8, 10% NaCl 5M], TSE3 [LiCl 1 M, NP 40, Na deoxycholate, EDTA 0,5 M pH 8, Tris HCl pH 8] et le tampon TE [EDTA 0,5 M pH 8, Tris HCl pH 8]. Aux tubes sont ajouté 200 µl de tampon d'élution (SDS 10%, NaHCO₃ 1 M) suivi d'une incubation à 65°C pendant 20 minutes entrecoupée d'une agitation (vortex) toutes les 2 minutes dans le but de séparer les billes d'agarose du complexe ADN-anticorps. Après centrifugation à 13000 rpm pendant une minute, le surnageant est transféré dans un nouveau tube et y est ajouté 10 µl de NaCl 5 M. L'input

est dégelé et on y ajoute 198 µl de tampon TE et 10 µl de NaCl 5 M. Les tubes A, B, C et l'input sont incubés pendant 16h à 65°C. Le lendemain, 2 µl d'ARNase A (Roche) sont ajoutés aux tubes, suivis d'une incubation de 30 minutes à 37°C. Par la suite, 2 µl de protéinase K (Roche) sont ajoutés aux tubes et une dernière incubation de 2h à 42°C est réalisée. Les échantillons sont alors purifiés (QIAquick, *PCR purification Kit*) et sont prêts pour la réaction de PCR afin d'amplifier l'ADN immunoprécipité. Les amorces sont confectionnées de façon à amplifier l'ADN comportant les éléments de réponse pour MYC sur le promoteur du gène de la cycline D1, *CCND1* qui comporte un élément E-box complet, et utilisé comme contrôle positif. D'autres amorces sont produites dans le but d'amplifier l'ADN correspondant à la partie du promoteur du gène *ITGA1* comportant les éléments de réponse supposés pour MYC. Comme contrôle négatif, un autre set d'amorce est synthétisé de façon à amplifier une séquence d'ADN ne comportant aucun élément de réponse pour MYC (liste des amorces au Tableau VIII).

Pour le calcul de l'enrichissement de l'ADN, la valeur du produit d'amplification de l'ADN immunoprécipité par l'anticorps anti MYC obtenu par l'amorce ciblant la région d'intérêt sur le promoteur du gène *ITGA1* et la région contrôle, est soustraite de la valeur du produit d'enrichissement de l'ADN de chargement (Input). Le log2 de la différence entre les deux valeurs résultantes correspondra au produit d'enrichissement de l'ADN de la région promotrice du gène *ITGA1* immunoprécipitée par l'anticorps anti MYC comparé à l'ADN de chargement et de la région contrôle. Le même calcul est effectué pour l'expérience B utilisant l'anticorps anti-ARN POLII et la condition C utilisant l'anticorps IgG de souris comme contrôle négatif.

Tableau VIII. Séquence des amorces utilisées pour l'immunoprécipitation de la chromatine.

Nom	Amorce
Promoteur <i>ITGA1</i>	Sens 5'-cagtgagatttcagagaccaag-3'
	Anti-sens 5'-ctggctgggccacttatac-3'
Promoteur <i>CCND1</i>	Sens 5'-gaaacttgacaggggtgt-3'
	Anti-sens 5'-gccaaagaatctcagcgact-3'
Contrôle génomique négatif	Sens 5'-ggatgcagtgtccttctccccagat-3'
	Anti-sens 5'-gtcgccacaggtgtcgctcaagtct-3'

3.16. Génération des virus sh-MYC, sh- α 1 et sh-Ctrl (contrôle):

Les lentivirus ont été générés par transfection transitoire de la lignée 293T, comme effectué précédemment (Benoit et al., 2010; Boudjadi et al., 2013). La veille de la transfection, un Pétri à 90% de confluence est divisé à un rapport de 1 dans 5. Le jour suivant, 5 μ g des vecteurs d'encapsulation VSVG, pLP1, et pLP2, du vecteur sh-MYC, sh- α 1 ou sh-Ctrl (Tableau IX), ont été ajoutés à 500 μ l de milieu de culture Opti-MEM (Invitrogen). Parallèlement, 40 μ l de lipofectamine (Invitrogen) sont incubés 5 minutes à TP dans 500 μ l d'Opti-MEM. Les deux solutions sont combinées et après une incubation de 25 minutes, le volume est complété à 5 ml avec l'Opti-MEM. Le tout est ajouté aux Pétris après avoir enlevé le milieu de culture DMEM 10% FBS. Le surnageant comportant les lentivirus est récupéré 48 heures après la transfection. Ce dernier est filtré avec un filtre de 45 μ m (Millipore) puis conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

Tableau IX. Séquence des sh-ARNs

sh-ARN	Séquences
sh- α 1-1	5'-ccggccacatttcaagtcgtgaatctcgagattcacgacttgaaatgtgggttttg-3'
sh- α 1-2	5'-ccgggtgggcatcaaagacgtgtttctcgagaaacacgtctttga tgc ccactt ttg-3'
sh-MYC-1	5'-ccggatcatcatccaggactgtatgctcgagcatacagtcctggatgatgatttttg-3'
sh-MYC-2	5'-ccggcctgagacagatcagcaacaactcgagttgttgctgatctgtctcagggttttg-3'
sh-Ctrl	5'-ccgggtgggcatcaaagacgtgtttctcgagaaacacgtctttgatgc cca ctt ttg-3'

3.17. Infection des cellules tumorales coliques :

Les infections lentivirales ont été effectuées suivant la procédure utilisée au laboratoire (Benoit et al., 2012; Boudjadi et al., 2015). Pour les réaliser, des Pétris de 100 mm comportant les cellules HT29, T84 ou SW480 portées à 60% de confluence ont été utilisés. 500 µl de milieu comprenant les virus ont été ajoutés à un ml de milieu de culture pour un total de 1,5 ml de milieu. À ce dernier a été ajouté 8 µg/ml de polybrène (Sigma). Le mélange a été ajoutés aux Pétris, et le tout a été incubé une heure dans l'incubateur à 37°C avec une agitation douce chaque 15 minutes. Par la suite le volume est complété à 5 ml et l'incubation est portée à 48 heures. Le milieu de culture est ensuite changé et les cellules infectées sont sélectionnées avec un milieu de culture approprié pour chaque lignée comportant 5-10 µg/ml de puromycine (Sigma). La sélection par la puromycine est portée à une durée de 10 jours et un passage est effectué chaque fois que les cellules atteignent la sous confluence.

3.18. Courbe de croissance :

Dans le but de vérifier si l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses colorectales, un premier test est réalisé et qui consiste à compter le nombre des cellules tumorales des deux populations sh- $\alpha 1$ et sh-Ctrl sur une durée déterminée (Groulx et al., 2014). Les cellules sous confluentes sontensemencées dans des plaques de 12 puits à raison de 50000 cellules/puits, puis leur nombre est compté toutes les 48 heures sur une durée allant de 4 à 6 jours selon la lignée cellulaire et seule les cellules vivantes sont comptées. Une fois le milieu de culture retiré, et après un lavage au PBS, les cellules sont trypsinisées à 37°C pendant 3 à 5 minutes. Immédiatement et après une brève homogénéisation, un volume contenant les cellules est ajouté au bleu de trypan (Sigma), homogénéisé puis les cellules sont comptées en utilisant un compteur de cellules (TC10 *Automated Cell Counter*, Bio-Rad, Saint-Laurent, QC). Le bleu de trypan diffuse seulement à l'intérieur des cellules mortes, ce qui permet au compteur de les exclure du nombre des cellules vivantes.

3.19. Incorporation du BrdU :

Le 5-Bromo-2-désoxyuridine (BrdU) est un nucléoside synthétique analogue de la thymidine largement utilisé dans le but de quantifier la prolifération cellulaire, car celui-ci est incorporé dans l'ADN nouvellement synthétisé par les cellules qui sont en phase S. Cette phase correspond à l'étape de réplication de l'ADN. L'expérience a été réalisée comme décrit précédemment (Khalfaoui et al., 2013; Groulx et al., 2014). Tout d'abord des lamelles de verre (Fisher) sont stérilisées à l'éthanol 70%, séchées puis mises dans des plaques de 12 puits. Un ml de sérum FBS (Wisent) est ajouté et le tout est incubé à 37°C pendant 2 heures. Le sérum est ensuite retiré et les cellules sontensemencées à nombre égal dans chaque puit. Quatre jours plus tard, le milieu de culture est remplacé par un nouveau milieu comportant du BrdU (1/1000, Roche Diagnostics, IN) et les cellules sont incubées pendant 2 heures à 37°C. Subséquemment, le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées au PBS froid à trois reprises pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite fixées au méthanol pendant 10 minutes à -20°C suivi de trois autres lavages au PBS froid de 5 minutes chacun. Cette étape est suivie d'une incubation des cellules avec une solution de Xagor (HCl 4M, Fisher) pendant exactement 7 minutes, ce qui permet l'exposition de l'antigène BrdU. Après trois autres lavages au PBS pendant 5 minutes chacun, les cellules sont incubées pendant 10 minutes avec une solution de blocage [PBS, BSA 0,5% (Wisent), Tween-20 0.1% (Fisher)]. Les cellules sont ensuite incubées, pendant 45 minutes à 37°C, avec l'anticorps anti-BrdU conjugué au FITC (fluoresceine isothiocyanate, Roche) dilué 1/50 dans la solution de blocage. Après deux lavages de 5 minutes au PBS froid, les cellules sont ensuite incubées avec une solution de DAPI pendant 3 minutes à TP, suivi d'un lavage de 5 minutes au PBS. Les lamelles sont ensuite montées sur des lames de verre utilisant un milieu de montage adapté à l'immunofluorescence. L'observation a été faite utilisant un microscope Leica (DMRXA microscope, Leica) équipé de la caméra RTE/CCD Y/Hz-I300 (Leica) et pour chaque condition deux champs ont été photographiés et analysés de façon aléatoire. Le pourcentage des cellules positives au BrdU a été déterminé par le compte des cellules marquées au BrdU par rapport aux cellules positives au DAPI.

3.20. Test de migration :

Les cellules des deux populations sh- α 1 et sh-Ctrl sont tout d'abord maintenues en sous confluences et en sélection par la puromycine à la concentration indiquée pour chaque lignée. Ensuite, les cellules sont trypsinisées puisensemencées à haute densité dans des plaques à 6 puits. Le lendemain, et après vérification que les cellules tapissent toute la surface du Pétri, le milieu est changé en y ajoutant de l'hydroxyurée (Sigma) à la concentration finale de 2 mM. 24 heures plus tard, deux blessures sont réalisées dans chaque puits à l'aide d'un cône de pipette. Après trois lavages au PBS afin d'éliminer les cellules décollées, un nouveau milieu est ajouté au Pétri contenant la puromycine, l'hydroxyurée (2mM, Sigma) et du collagène 1 (20 μ g/ml, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Dans le but de suivre la progression de la fermeture de la blessure, une ligne est tracée sous le Pétri de façon perpendiculaire au trait de blessure. La visualisation est faite grâce à un microscope à foyer inversé (M40-82797, WLID Heerburgg, Leica Canada, Toronto), et des photographies sont réalisées aux temps 0h, 6h, 24h et 48h utilisant une caméra (RS Photometrics CoolSNAP, Tucson, AZ) et un logiciel d'acquisition (RS Image Version 1.9.2, Roper Scientific, Allemagne). L'avancement de la fermeture des blessures est quantifié à l'aide du logiciel Metamorphe (*Metamorph Imaging System, Universal Imaging Corp*), qui permet de mesurer la surface du Pétri encore non recouverte par les cellules. Pour chaque condition, la surface initiale (temps 0) est comparée à la surface au temps final de l'expérience. Le rapport entre ces deux surfaces déterminera le degré de fermeture de la blessure par les cellules tumorales.

3.21. Test d'anoïkose :

La procédure suivie pour les tests d'anoïkose a été effectuée comme décrit précédemment (Demers et al., 2009; Beausejour et al., 2012).

- Un test d'anoïkose est effectué dans le but de tester la résistance des cellules épithéliales intestinales à la perte de l'adhésion à la matrice extracellulaire, qui est représentée *in*

vitro par le plastique du Pétري de culture et les protéines déposées par les cellules elles-mêmes. Pour cela, les Pétris sont recouverts au préalable par du polyHEMA [poly (2-hydroxyethyl methacrylate), Sigma] un non adhérent qui empêchera les cellules de s'attacher au Pétري.

Le polyHEMA est tout d'abord dissous dans l'éthanol à raison de 10mg/ml sous agitation à une température de 30°C durant la nuit ou 16 heures au minimum. Par la suite, 6 ml de la solution de polyHEMA sont versés dans chaque Pétري suivi d'un séchage aux ultraviolets sous la hotte pendant 1 heure à 1h30. Un autre 6 ml de la solution de polyHEMA est ajouté suivi de la même procédure de séchage, dans le but de réaliser une deuxième couche de polyHEMA. Les boîtes de Pétري sont scellées par du parafilm (Bemis, Oshkosh, WI) et elles sont gardées, jusqu'à utilisation, à +4°C pendant un mois au maximum.

Les Pétris de polyHEMA, rendus à TP, sont rincés avec du milieu de culture sans sérum. Les cellules en culture sont tout d'abord lavées au PBS, trypsinisées et ensuite resuspendues dans 10ml de milieu de culture complet approprié pour chaque lignée, et le tout est transféré dans des tubes de 15 ml. Les cellules sont centrifugées à 1000 rpm à TP pendant 5 minutes. Le milieu complet est ensuite retiré et le culot cellulaire est resuspendu dans un milieu dépourvu de sérum et les cellules sontensemencées dans les Pétris de polyHEMA et sont mises en culture pendant 24 heures.

Pour récupérer les cellules, celles-ci sont récoltées avec le milieu de culture sans sérum et le tout est transféré dans des tubes de 15 ml avant de culoter les cellules par une centrifugation de 5 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est ensuite retiré et le culot cellulaire est lavé avec du PBS suivi d'une autre centrifugation de 5 minutes à 1000 rpm. Immédiatement, le culot est resuspendu dans un tampon RIPA [Tris HCl pH 8.0 50mM, NaCl 150mM, DTT 1mM, EDTA 0,5M, NP-40 0,5%, Na deoxycholate Acid 0,5%, SDS 0.1%, Na Vanadate 100 µM, PMSF/Isopropanol 1mM, β-glycérolphosphate 40mM, une pastille d'inhibiteurs de protéases (Roche)] sans pNPP (p-nitrophenyl phosphate). Le tout est directement incubé sur glace pendant 30 minutes entrecoupées d'un mélange toutes les

10 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13000 rpm pendant 20 minutes et le surnageant est ensuite récupéré dans de nouveaux tubes. Les protéines sont dosées puis les tubes sont stockés à -80°C.

- Dans une autre expérience séparée, les cellules sont tout d'abord mises en culture avec le milieu de culture complet adapté à chaque lignée cellulaire. En s'assurant que la confluence des cellules ne dépasse pas 60%, le milieu de culture est retiré et les cellules adhérentes au Pétri sont lavées avec du PBS à deux reprises dans le but de retirer complètement le milieu de culture avec sérum. Ensuite un milieu de culture sans sérum est ajouté aux Pétris et une incubation de 48 heures est effectuée. Le lendemain, le milieu de culture sans sérum est retiré et les cellules sont lavées au PBS puis trypsinisées et ensuite récoltées dans le tampon RIPA sans pNPP. À cette étape, les extraits sont traités de la même façon que les échantillons des cellules en suspension.

3.22. Essais caspases :

Pour ce test, un dosage de l'activité de la caspase 3 a été réalisé (Beausejour et al., 2013). Pour chaque échantillon, 30 µg de protéines sont prélevés et les volumes sont complétés de manière égale avec du tampon RIPA sans pNPP. Un tube comportant seulement du pNPP est utilisé comme contrôle négatif (blanc). Ensuite, dans chaque tube est ajouté 500 µl de tampon de réaction [HEPES 1M, Glycérol 20%, DTT 1M], et 2 µl de substrat (5mM) puis le tout est incubé deux heures à 37°C. Après un mélange rapide, un autre 500 µl de tampon de réaction est ajouté à chaque échantillon et la lecture est ensuite faite au spectrophotomètre à 380 nm pour l'excitation et entre 405-500nm pour l'émission. L'apex du blanc est rapporté à tous les échantillons. Les résultats sont rapportés en valeurs relatives par rapport au contrôle de chaque condition.

3.23. Xénogreffes :

Afin de déterminer si l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est impliquée dans la tumorigénicité des cellules tumorales colorectales, des souris femelles athymiques CD1 nu/nu ont été achetées de la compagnie Charles Rivers (Wilmington, MA). Comme décrit précédemment (Groulx et al., 2014), des populations stables des lignées HT29 et T84 exprimant soit le sh-Ctrl soit le sh- $\alpha 1$ ont été injectées dans le tissu sous cutané dans la région dorsale de ces souris à raison de 2×10^6 cellules suspendues dans 100 μ l de milieu de culture. Une fois les tumeurs visibles et palpables, le volume des tumeurs néoformées a été mesuré dans deux axes différents et calculé selon la formule ($V^3 = d^2 \times D \times 0.5$) où (d) représente le petit diamètre et (D) le diamètre le plus grand. Après euthanasie des souris, les tumeurs ont été prélevées et coupées en deux selon le grand axe. Une moitié du tissu tumoral a été fixée au PFA et a servi pour l'analyse histologique après colorations standards à l'hématoxyline/éosine et des colorations immunohistochimiques. La deuxième moitié a servi pour l'extraction des protéines. Le protocole utilisé pour cette expérience a été approuvé par le comité d'éthique sur les expérimentations animales de l'Université de Sherbrooke. Les lames ont été numérisées en utilisant un digitaliseur de lames (Nanozoomer 2.0-RS, Hamamatsu, Boston, MA) et visualisées utilisant le logiciel NDP.view2 (NDP viewing software U12388-01, Hamamatsu).

4. Résultats :

4.1. Profils d'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les muqueuses intestinale et colique :

Dans cette étude nous avons montré que la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines est exprimée par les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale (figure 8A) qui se trouvent au niveau de la zone proliférative de la crypte, comme décrit précédemment par une étude antérieure de notre laboratoire (Beaulieu 1992). Dans le fond de la crypte, les cellules différenciées de Paneth montrent une faible expression de la sous-unité $\alpha 1$ alors qu'elles expriment la phospholipase A2 (figure 8B) et sont connues pour exprimer le lysozyme et l'alpha défensine 5. $\alpha 1$ n'est pas exprimée par les cellules différenciées de la villosité intestinale. Cette observation est concordante avec le profil d'expression de cette sous-unité qui va en diminuant avec le degré de confluence (différentiation) des cellules Caco-2/15 et qui contraste avec une augmentation de l'expression de la sucrase-isomaltase, un marqueur de différenciation des cellules intestinales (Beaulieu et al., 1989; Beaulieu et Quaroni 1991; Vachon et Beaulieu 1992). En effet, $\alpha 1$ est fortement présente dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes, alors que son expression diminue pour devenir beaucoup plus faible 30 jours après la confluence (figure 8C). Au niveau de la muqueuse colique, nous avons observé que la sous-unité $\alpha 1$ est présente dans les cellules épithéliales de la crypte comme observé dans la muqueuse intestinale, avec une expression plus forte dans le fond de la crypte colique, plus faible dans la partie haute de la crypte et encore plus faible voir absente dans les cellules composant l'épithélium de surface (figure 8D, figure 9A). Dans la muqueuse intestinale comme celle du côlon, $\alpha 1$ est fortement exprimée par les cellules musculaires lisses de la musculaire muqueuse et celles des vaisseaux sanguins.

4.2. Localisation subcellulaire de la sous-unité $\alpha 1$ dans la muqueuse colique et l'adénocarcinome du côlon :

Dans les cellules tumorales épithéliales de l'adénocarcinome du côlon moyennement différencié, $\alpha 1$ est exprimée au niveau de la membrane basolatérale des cellules cylindriques comme observé dans les cellules épithéliales normales de la crypte de la muqueuse colique (figure 9 B). Les cellules tumorales ont un noyau, pour la majorité des

cellules, en position basale ainsi qu'un pôle muqueux ouvert du côté apical (figure 9B). Ces cellules sont nettement distinguées des myofibroblastes par la membrane basilaire qui est marquée en vert par les anticorps anti-laminine 1, celle-ci étant un des composants majeurs de la lame basale épithéliale. Les myofibroblastes sont des cellules allongées, fusiformes qui apparaissent dans l'onglet de la figure 9B en couleur orange du fait qu'elles expriment $\alpha 1$ et la laminine 1.

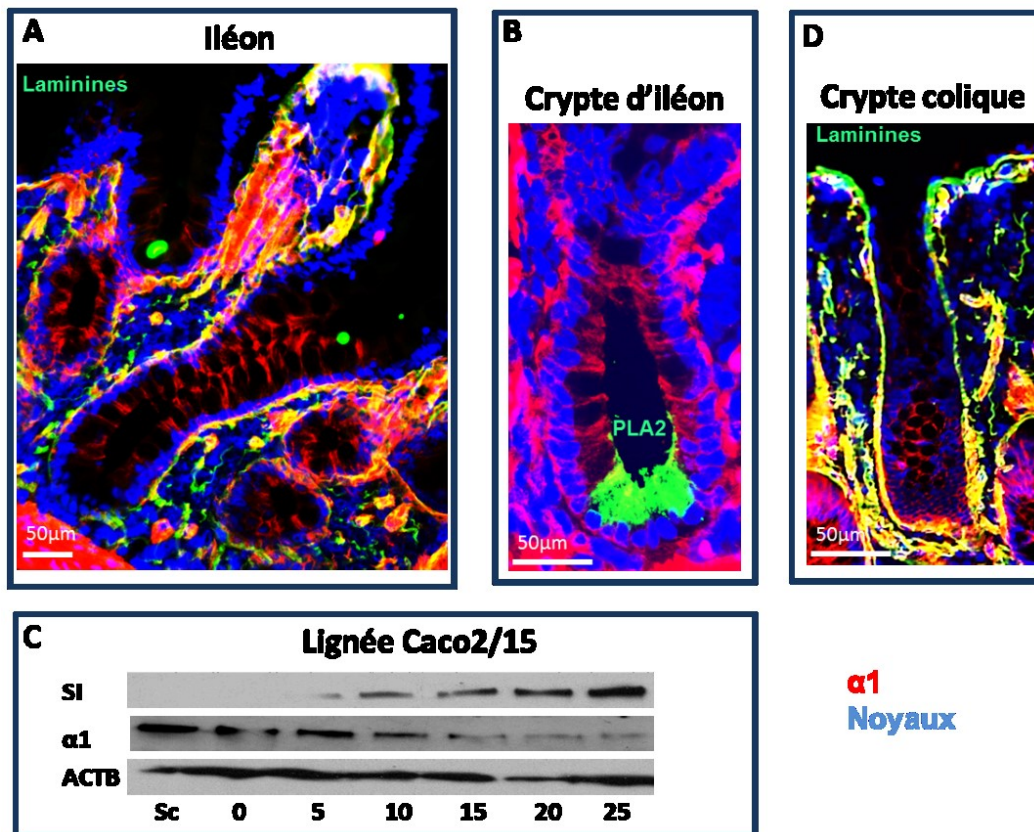


Figure 8. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans la muqueuse de l'intestin grêle, du côlon et dans la lignée Caco 2/15. **A.** Partie de la muqueuse iléale montrant un axe crypte-villosité tapissé d'une monocouche de cellules épithéliales qui expriment $\alpha 1$ seulement au niveau des cellules de la crypte. **B.** Expression de la sous-unité $\alpha 1$ par les cellules d'une crypte iléale. Les cellules de Paneth sont marquées en vert par les anticorps anti-PLA2. **C.** immunobuvardage montrant l'expression de la Sucrase Isomaltase (SI) et celle de la sous-unité $\alpha 1$. L'expression de l'actine (ACTB1) a été utilisée comme contrôle de chargement. **A-D,** la sous-unité $\alpha 1$; rouge, noyaux; bleue, Laminine 1; vert, excepté B où PLA2 est marquée par la fluorescence verte.

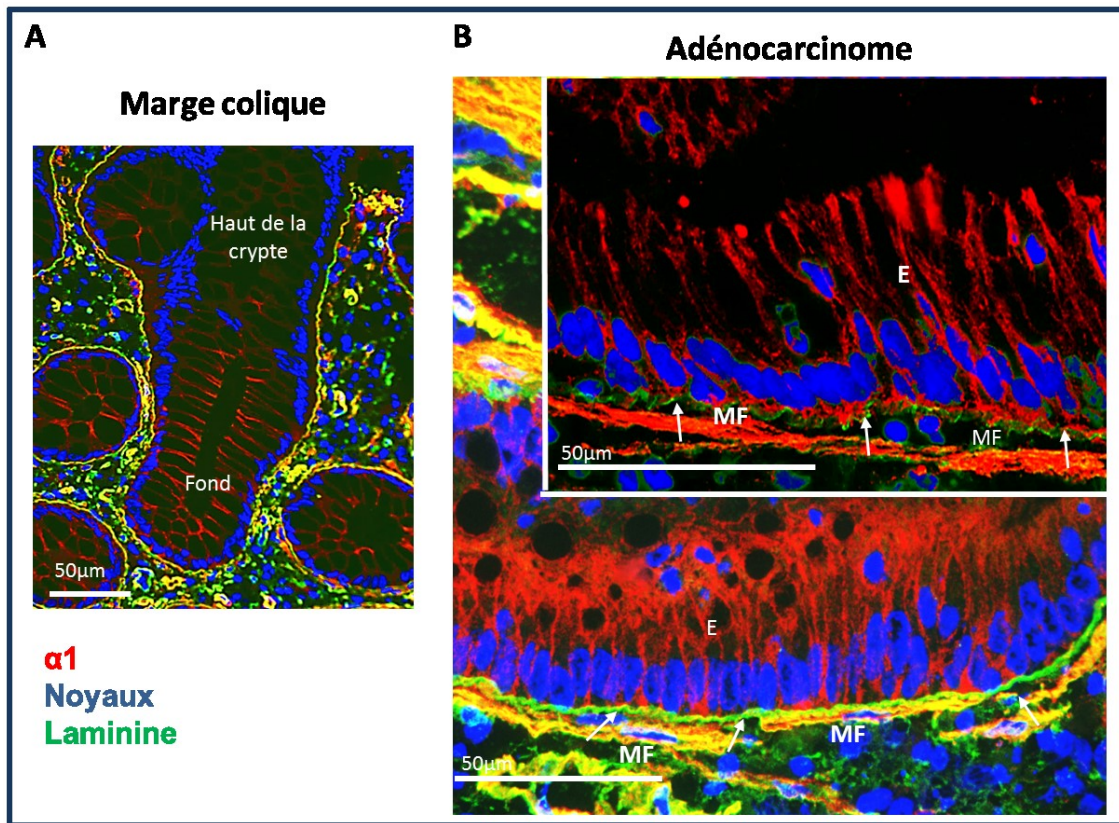


Figure 9. Immunolocalisation de la sous-unité $\alpha 1$ dans l'adénocarcinome du côlon. **A.** Crypte colique montrant la sous-unité $\alpha 1$ exprimée au niveau des cellules du fond de la crypte alors que son expression est plus faible dans sa partie supérieure. **B.** Image d'un adénocarcinome du côlon moyennement différencié montrant que la sous-unité $\alpha 1$ est présente au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales tumorales (E) mais aussi au niveau des myofibroblastes (MF) dont elles sont séparées par la membrane basilaire marquée par la détection de la laminine 1. Adapté de (Boudjadi et al., 2013).

4.3. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans le cancer colorectal :

Dans le but d'analyser l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans le CCR nous avons sélectionné 65 tumeurs colorectales et leurs marges de résection respectives issues de la banque des tissus de l'équipe de physiopathologie digestive de l'Université de Sherbrooke. Le tableau X résume les données anatomopathologiques et les caractéristiques moléculaires de ces

tumeurs. Cette partie de notre étude a porté sur l'expression du messenger du gène *ITGA1* et la protéine $\alpha 1$.

L'analyse par qPCR a montré une augmentation significative des niveaux du transcrit du gène *ITGA1* dans 86.2% des 65 adénocarcinomes analysés, allant de 2 à 30 fois son expression dans la marge de résection correspondante à chaque tumeur (figure 10A). Cette augmentation est observée dans tous les stades mais sans variation significative suivant le degré d'avancement du CCR (figure 10B). Le fait que l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ soit présente dès le premier stade du CCR suggère que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ peut être impliquée dans les premiers événements de la progression tumorale. Par contre, nous n'avons pas observé de corrélation significative entre l'expression du gène *ITGA1* et les mutations de *P53*, *BRAF*, *KRAS*, *APC/CTNNB1* ni avec le profil de l'instabilité des microsatellites.

En immunohistochimie, nous avons tout d'abord confirmé la spécificité de l'anticorps que nous avons utilisé pour la détection de la sous-unité $\alpha 1$. Comme le montre la figure 11 (A et B), l'utilisation de l'anticorps anti- $\alpha 1$ de chèvre (Tableau VI) montre un marquage basolatéral au niveau des cellules épithéliales normales, des cellules épithéliales tumorales et un marquage au niveau des cellules du stroma de la tumeur. L'utilisation des IgGs non immuns comme anticorps primaires ne montre pas de marquage spécifique pour la sous-unité $\alpha 1$ (figure 11, C et D). L'analyse de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les 65 tumeurs a montré que son expression dans les cancers (figure 12 : B, D, H et J) était beaucoup plus forte par rapport à son expression dans les marges correspondantes (figure 12 : A, C, G et J). Certaines tumeurs exprimaient très faiblement la sous-unité $\alpha 1$ à un niveau comparable à la marge de résection (figure 12 E et F). Le tableau XI, où est noté le résultat des scores attribués aux tumeurs et à leurs marges, montre que la sous-unité $\alpha 1$ est présente dans 65% des tumeurs et elle est surexprimée dans 57% des cas par rapport aux marges appariées, en considérant son expression dans les cellules épithéliales seulement. Au niveau des adénocarcinomes moyennement différenciés, $\alpha 1$ est présente au pôle basolatéral (figure 12 : B et H) des cellules tumorales. Alors que dans les tumeurs peu différenciées où les cellules sont de petite taille et forment des amas, le marquage

de la sous-unité $\alpha 1$ est observé sous forme d'un fin liseré membranaire entourant les cellules (figure 12, D et J). La sous-unité $\alpha 1$ est observée également au niveau des cellules myoépithéliales (Figure 12, A, B et H) et dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins (figure 12, I). L'expression de la sous-unité $\alpha 1$ par les cellules épithéliales et celles du stroma nous a amené à faire une comparaison entre son expression au niveau des cellules épithéliales tumorales, les cellules épithéliales normales et les cellules stromales non tumorales. Nous avons observé que seulement 23% des cellules épithéliales non tumorales expriment $\alpha 1$ avec une intensité modérée à forte, alors que ce degré d'expression est observé dans 65% des cellules épithéliales tumorales et 97% des cellules non tumorales du stroma des tumeurs (Figure 13). Ce résultat suggère que la présence de la sous-unité $\alpha 1$ dans les composantes épithéliales tumorales et non tumorale, confère possiblement un rôle pro-tumoral de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans le CCR.

Paramètres	Description	valeur	(%)
Grade tumoral	1	0	0
	2	40	61.5
	3	18	27.7
	4	7	10.8
Stade TNM	1	8	12.3
	2	23	35.4
	3	26	40.0
	4	8	12.3
Instabilité des microsatellites	MSS	52	81.2
	MSI	12	18.8
APC/CTNNB1	Pas de mutation	37	57.8
	mutation	27	42.2
KRAS/BRAF	Pas de mutation	37	57.8
	Mutation oncogénique	27	42.2
P53	Pas de mutation	36	56.3
	mutation	28	43.7

Tableau X. Paramètres histopathologiques et caractérisation moléculaire des tumeurs des patients de la série des cancers colorectaux de la banque des tissus.

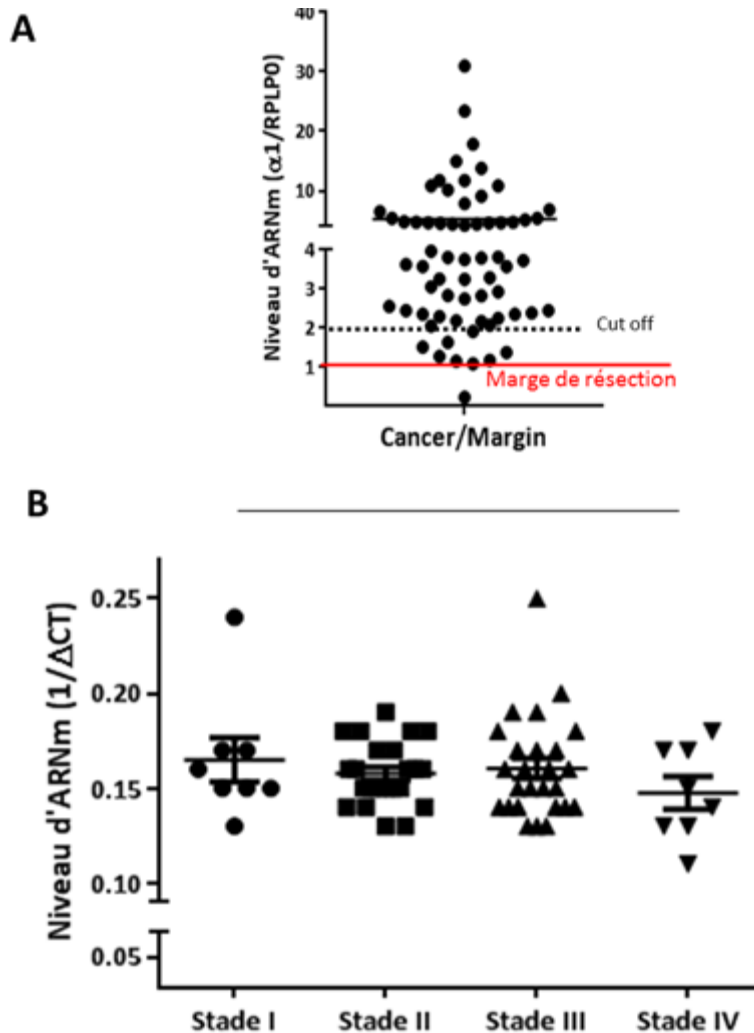


Figure 10. Expression du messager de la sous-unité $\alpha 1$ dans le cancer colorectal. **A.** Expression de l'ARNm du gène *ITGA1* évaluée par qPCR dans 65 cancers colorectaux par rapport aux marges de résection correspondantes. La ligne rouge correspond à un niveau d'expression du gène *ITGA1* équivalent entre les cancers et les marges correspondantes (pas de changement d'expression). Les points noirs correspondent aux valeurs d'expression du gène *ITGA1* exprimées en rapport de changement entre le cancer et le tissu de la marge correspondante. Ces valeurs ont été normalisées à l'expression du gène *B2M*. La ligne en pointillés correspond à un Cut-off déterminé à une limite de 2 fois l'expression dans la tumeur par rapport à la marge, $P < 0.001$, *One-Sample T Test*. **B.** Répartition de l'expression du gène *ITGA1* dans les 65 tumeurs en fonction du stade tumoral (stade 1; 8 patients, stade 2; 23 patients, stade 3; 26 patients et le stade 4; 8 patients). Adapté de (Boudjadi et al., 2013).

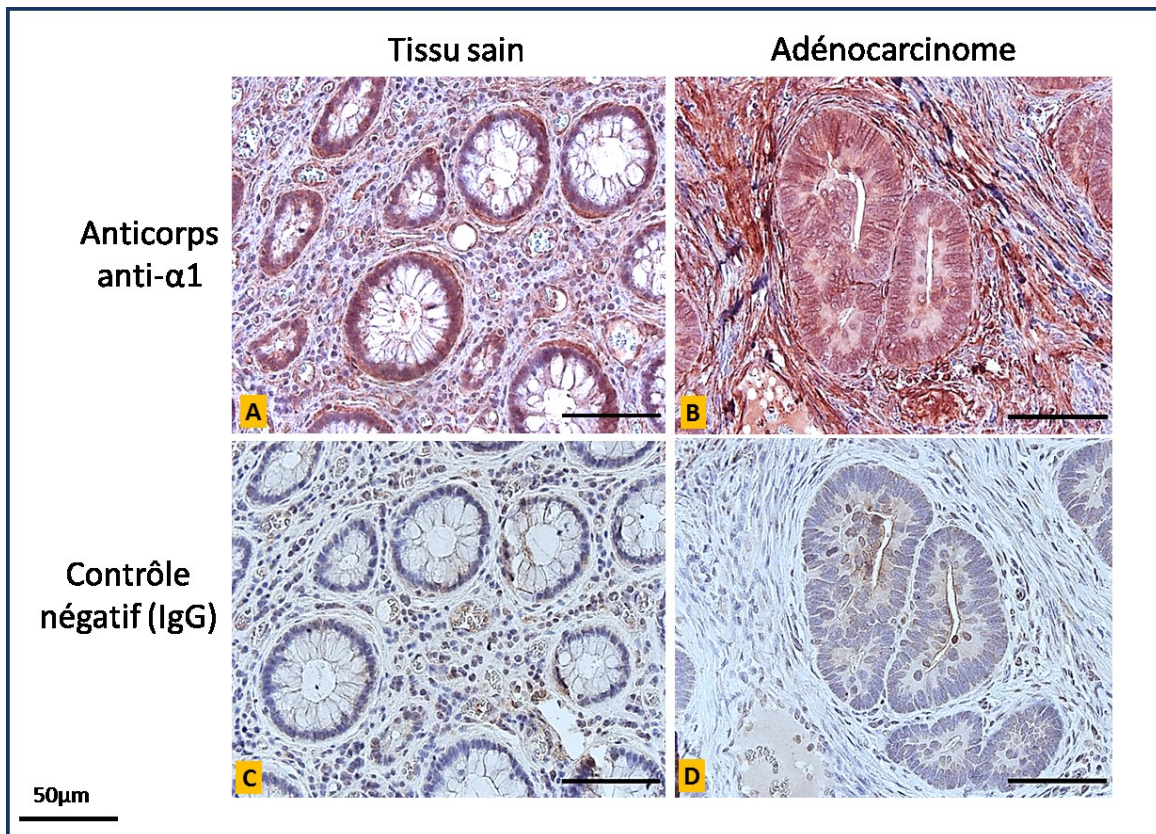


Figure 11. Validation de l'anticorps anti- α 1 en immunohistochimie. Dans le but de confirmer la spécificité de l'anticorps primaire anti- α 1, des sections successives du même échantillon de CCR et de la marge de résection correspondante ont été incubées en immunohistochimie soit en présence des anticorps primaires anti- α 1 (A et B), soit avec les anticorps anti-IgG non immuns utilisés comme contrôle négatif (C et D). Barre d'échelle = 50 μ m. Adapté de (Boudjadi et al., 2013).

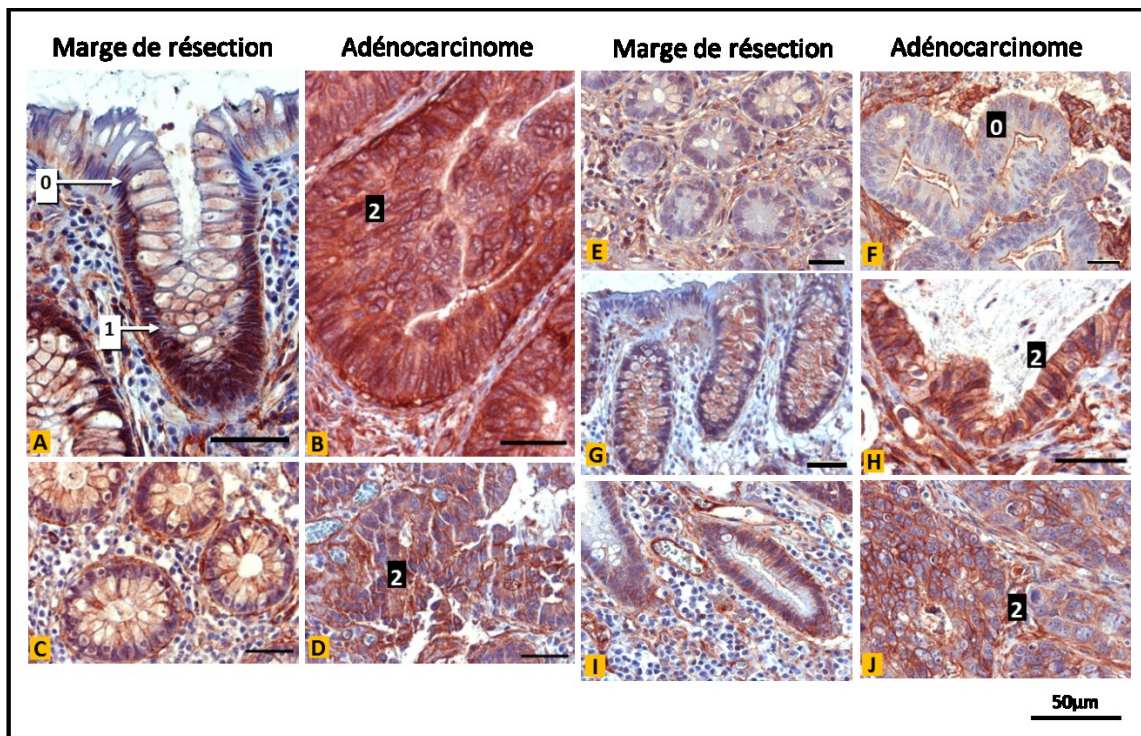


Figure 12. Images représentatives de l'expression immunohistochimique de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines dans le CCR. La sous-unité $\alpha 1$ est exprimée à des niveaux élevés dans un nombre significatif de tumeurs (B, D, H, J) par rapport aux marges appariées (A, C, G, I) où son expression est majoritaire dans les cellules prolifératives de la crypte et au-dessous des niveaux de détection dans les cellules épithéliales normales de surface (A, G). Notez que les myofibroblastes sous-épithéliaux ont également été marqués par les anticorps anti- $\alpha 1$ dans les tissus normaux (A, C, I) et des tumeurs (B, H, J). Les scores ont été soit 0, où l'expression est négative ou faible comparable à celle de l'épithélium de surface, soit 1 où l'intensité du marquage était modérée, et le score 2 correspondait à une expression d'intensité supérieure à celle de la crypte. Pour cette partie, l'analyse a seulement portée sur l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ par les cellules épithéliales normales de la crypte et les cellules épithéliales tumorales. Barre d'échelle = 50 μm . Adapté de (Boudjadi et al., 2013).

		Score de la tumeur			Total
		0	1	2	
Score de la marge	0	20	20	10	50
	1	3	4	7	14
	2	0	0	1	1
Total		23	24	18	65

Tableau XI. Récapitulatif des scores d'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les tumeurs comparés aux scores des marges de résection correspondantes. Les scores ont été attribués seulement aux cellules épithéliales (tumoraux et non tumoraux). Les détails des scores sont décrits dans la légende de la figure 12. L'expression de la sous-unité $\alpha 1$ était significativement supérieure dans 37 tumeurs (test de McNemar-Bowker, $p < 0.001$) par rapport aux marges appariées soit 57% de l'ensemble des tumeurs (scores en rouge), similaire dans 25 cas (38%) et inférieure dans seulement 3 cas (5%). Adapté de (Boudjadi et al., 2013)

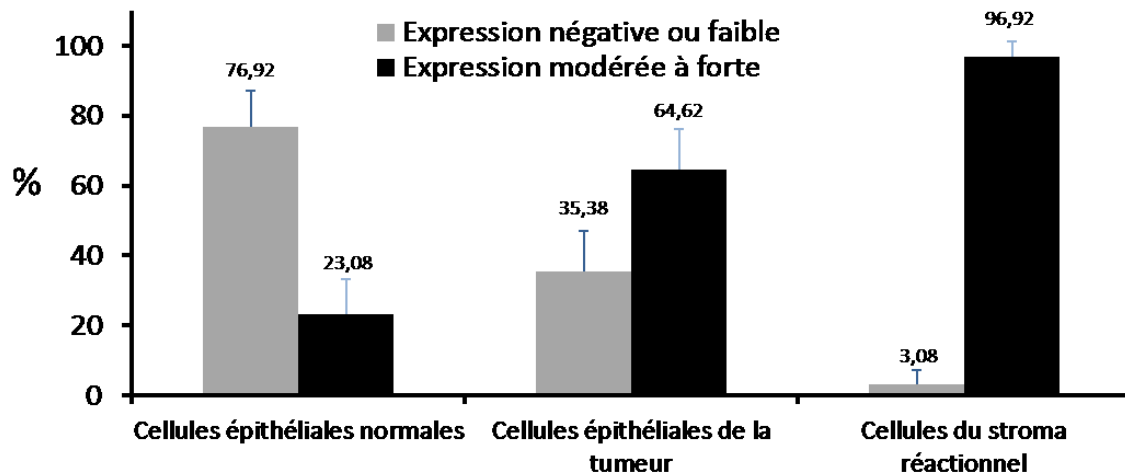


Figure 13. Quantification relative de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ entre les composantes épithéliale et stromale dans le tissu tumoral par rapport au tissu de la marge de résection. L'intensité de l'expression a été subdivisée en deux catégories : expression faible ou négative et expression modérée à forte. Le résultat montre que seulement 23% des cellules épithéliales normales expriment $\alpha 1$ de façon modérée à forte, alors que cette expression est observée dans 65% des cellules épithéliales et 97% des cellules stromales péri-tumorales. Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Adapté de (Boudjadi et al., 2013).

4.4. La méthylation de l'ADN n'est pas le mécanisme de régulation de l'expression du gène *ITGA1* dans le CCR :

Après avoir démontré que l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines est augmentée dans le CCR, nous avons étudié par la suite les mécanismes qui pourraient être responsables de cette expression. Nous avons observé qu' $\alpha 1$ est fortement présente dans les lignées tumorales colorectales HT29, SW480 et la lignée Caco2/15. Son expression est modérée dans les lignées T84, SW620 et LOVO et la protéine est très faiblement exprimée voir absente dans les deux lignées HCT116 et DLD1 (figure 14 A). En fait, il a été rapporté que l'expression du gène *ITGA1* est réprimée durant la différenciation des cellules hématopoïétiques en mégacaryocytes (Cheli et al., 2007). Le promoteur du gène *ITGA1* comporte un îlot CpG qui inclut plusieurs éléments CpG. Dans l'étude de Cheli et al, le traitement au bisulfite a montré que la plupart de ces éléments sont méthylés au cours du processus de différenciation de ces cellules. Nous avons vérifié si ce mécanisme de méthylation est impliqué dans l'absence d'expression du gène *ITGA1* dans les lignées HCT116 et DLD1. Pour cela, nous avons utilisé un agent de déméthylation de l'ADN, le 5-AZA, qui permet la réexpression des gènes après déméthylation de leur promoteur, comme c'est le cas du gène *IGFBP7* (*insulin-like growth factor-binding protein 7*) (Lin et al., 2007). Le traitement de la lignée HCT116 par le 5-AZA, pendant une durée de 7 jours n'a pas entraîné une réexpression du message du gène *ITGA1* (figure 14B) alors qu'il a provoqué une expression importante du transcrit du gène *IGFBP7* comme décrit précédemment dans différentes lignes tumorales coliques incluant la lignée HCT116 (Suzuki et al., 2010). Le fait qu'*ITGA1* soit exprimée dans plusieurs lignées tumorales coliques ainsi que ce résultat suggèrent fortement que la régulation de l'expression du gène *ITGA1* dans le CCR ne se fait pas par la méthylation de l'ADN.

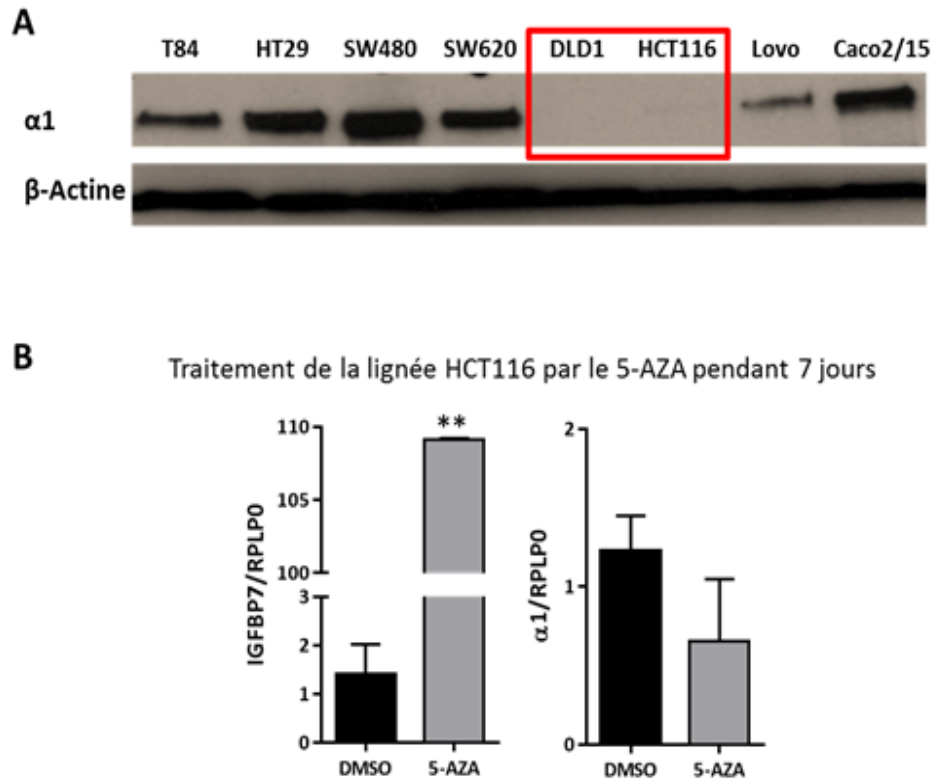


Figure 14. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans différentes lignées tumorales colorectales. **A.** Immunobuvardage représentatif montrant l'expression de la protéine $\alpha 1$ dans les lignées tumorales colorectales T84, HT29, SW480, SW620, DLD1, HCT116, Lovo et Caco2/15. L'expression de l'actine a été utilisée comme contrôle du chargement. **B.** Résultats de l'expression des messagers d'*IGFBP7* (gauche) et d'*ITGA1* (droite) obtenus par qPCR, après traitement de la lignée HCT116 par le 5-AZA pendant 7 jours par rapport au contrôle DMSO (Diméthylsulfoxyde). ** $p \leq 0.01$. Ns : non significatif.

4.5. Analyse du promoteur du gène *ITGA1* :

La régulation transcriptionnelle est l'un des mécanismes les plus importants dans la régulation de l'expression des gènes qui fait intervenir différents types de facteurs de transcription et leurs cofacteurs, qui vont influencer directement l'expression des gènes cibles. Ces facteurs se lient dans des régions précises de l'ADN dont les promoteurs de gènes et qui correspondent à la séquence de l'ADN précédant immédiatement le site d'initiation de la transcription. Dans ces régions sont présentes de courtes séquences d'ADN appelées éléments de réponse (ER) qui vont être reconnus par les facteurs de transcription. Nous avons donc procédé à une analyse bio-informatique de la séquence promotrice du gène *ITGA1* utilisant le logiciel MatInspector (version 2.7) à la recherche d'éléments de réponse pour des facteurs de transcription impliqués dans le cancer colorectal. Nous avons identifié deux ER pour le facteur TCF4, connu pour être la cible de la voie Wnt/ β -caténine, qui est souvent activée dans le CCR (Kolligs et al., 2002; Hatzis et al., 2008) et 2 ER pour le facteur de transcription MYC, un oncogène impliqué dans la progression du CCR (Sikora et al., 1987; Myant et Sansom 2011). Plusieurs éléments de réponse pour TCF4 ont été identifiés dans la littérature incluant la séquence optimale AAGATCAAAGG (van de Wetering et al., 1997; van Beest et al., 2000), la séquence CATCAAAGG (Hatzis et al., 2008) et la séquence courte A/T-TCAAAG (Hatzis et al., 2008). Les deux séquences CTCAAAG et AGCAAAG que nous avons identifiées sont plus proches de la séquence courte pour le facteur TCF4. Malgré la présence de ces deux ER, le test promoteur gène rapporteur que nous avons effectué n'a pas montré de différence significative dans l'activité du promoteur du gène *ITGA1* en présence soit du vecteur d'expression du facteur TCF4 ou celui de la β -caténine en comparaison au vecteur vide (figure 15A). Ce résultat indique que les deux éléments de réponses identifiés sur le promoteur du gène *ITGA1* ne sont pas fonctionnels.

Le facteur de transcription MYC est connu pour se lier avec son partenaire MAX à la séquence consensus CACGTG appelée E-box (Blackwood et Eisenman 1991; Fernandez et al., 2003). Le premier ER que nous avons identifié sur le promoteur du gène *ITGA1* est le

CAAGTG, que nous avons dénommé BOX-S1, situé entre -249 et -244 par rapport au site d'initiation de la transcription. Ce site se différencie de la séquence E-box que par une adénine (A) à la place de la cytosine, troisième nucléotide dans la séquence CACGTG. Le deuxième élément est le CAGATG, que nous avons appelé BOX-S2, se trouve entre les positions +26 et +31 sur le promoteur du gène *ITGA1*. Ce site a une similitude avec l'élément CACATG également décrit comme site de liaison de MYC-MAX à l'ADN (Fernandez et al., 2003). Les essais luciférase que nous avons effectués montrent clairement que l'activité du promoteur du gène *ITGA1* est augmentée avec la transfection du vecteur d'expression de MYC par rapport au vecteur vide (figure 15B). Cette activité a été fortement réduite lors de la transfection de MAD seul ou en présence de quantités équivalentes du facteur MYC (figure 15B), MAD étant un compétiteur de MYC pour la liaison avec MAX (Ayer et al., 1993; Grandori et al., 2000). Dans le but de confirmer si les deux ER que nous avons identifiés dans le promoteur du gène *ITGA1* sont impliqués dans l'action de MYC sur l'activité de ce promoteur, nous avons procédé par mutation sélective de ces deux ER, pour créer deux nouveaux sites ; M-BOX-S1 et M-BOX-S2 qui ne devraient pas être reconnus par MYC (Figure 16). L'essai luciférase montre que la mutation de l'un ou l'autre de ces deux ER entraîne une réduction significative de l'activité du promoteur du gène *ITGA1*, même en présence de MYC en comparaison avec une importante activité du promoteur non muté (figure 17). Ce résultat suggère que les deux éléments de réponse que nous avons nouvellement identifiés ont un rôle combiné dans le contrôle du promoteur du gène *ITGA1* par le facteur oncogénique MYC.

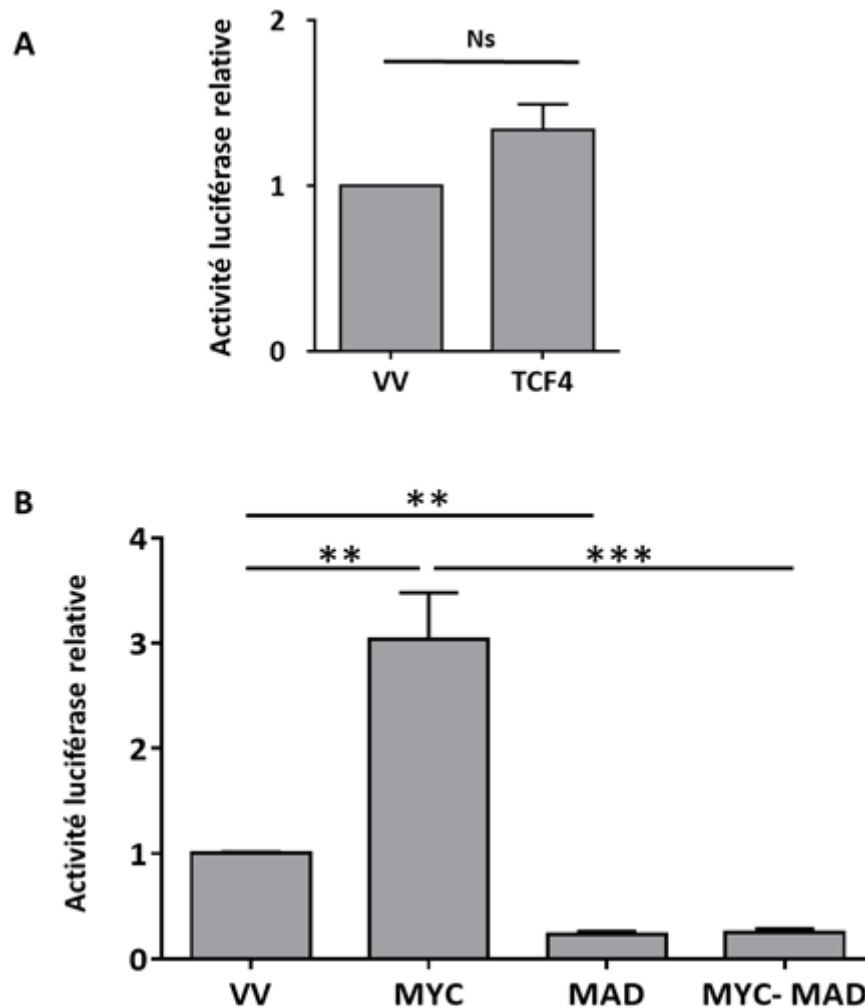


Figure 15. Régulation transcriptionnelle du promoteur du gène *ITGA1*. Le promoteur du gène *ITGA1* couplé au gène Renilla tous les deux insérés dans le vecteur d'expression *pLightSwitch-Prom* ont été transfectés dans les cellules 293T. L'activité du promoteur a été déterminée par la mesure de l'activité de la Renilla et le résultat a été exprimé par rapport au vecteur vide. Le vecteur d'expression de la Luciférase (firefly) a été utilisé comme contrôle de la transfection dans toutes les conditions. **A.** Les activateurs transfectés sont soit le vecteur vide, soit le vecteur d'expression du TCF4. **B.** Transfection du vecteur vide (VV), des vecteurs d'expression de MYC, de MAD ou les deux ensembles. Les résultats sont présentés comme des moyennes avec erreur type. Les expériences ont été effectuées trois fois de façon indépendante, chaque fois en triplicata. **P<0.01, ***P<0.001. Ns : non significatif. Adapté de (Boudjadi et al., 2015).

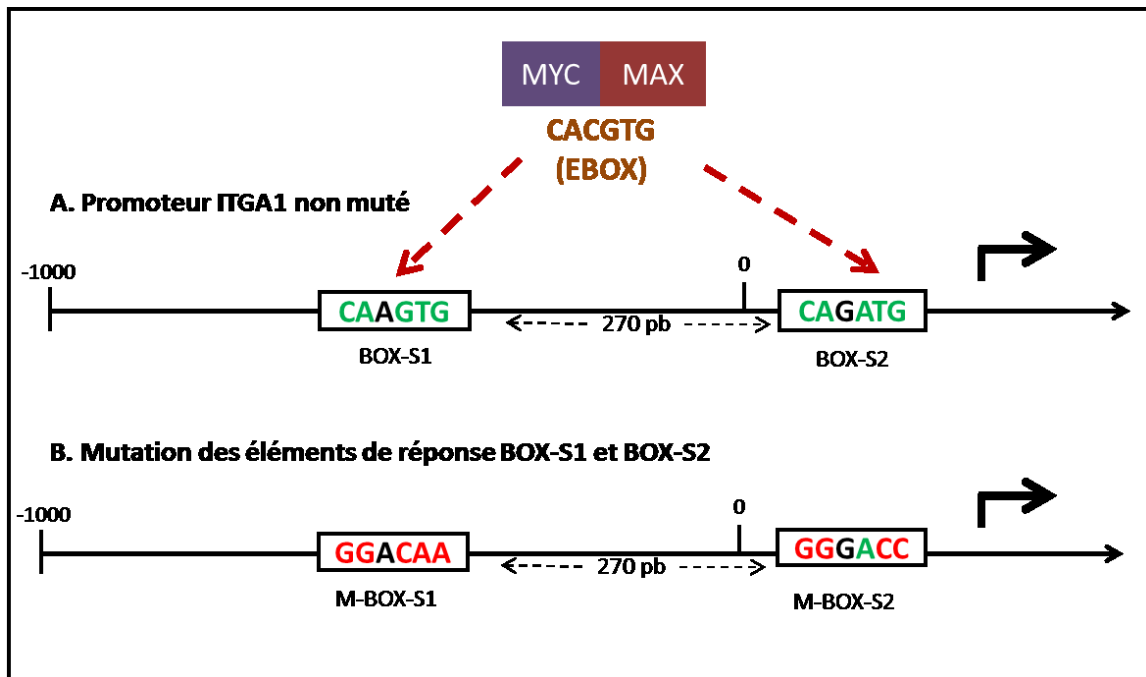


Figure 16. Représentation schématique des éléments de réponse pour MYC sur le promoteur du gène *ITGA1*. A. Promoteur du gène *ITGA1* non muté comportant les deux possibles éléments de réponse BOX-S1 et BOX-S2 (en vert, les nucléotides communes avec la séquence consensus E-Box). B. Destruction des deux éléments de réponse pour MYC et création de deux séquences ne pouvant être reconnues par MYC (les nucléotides changées sont en rouge). Adapté de (Boudjadi et al., 2015).

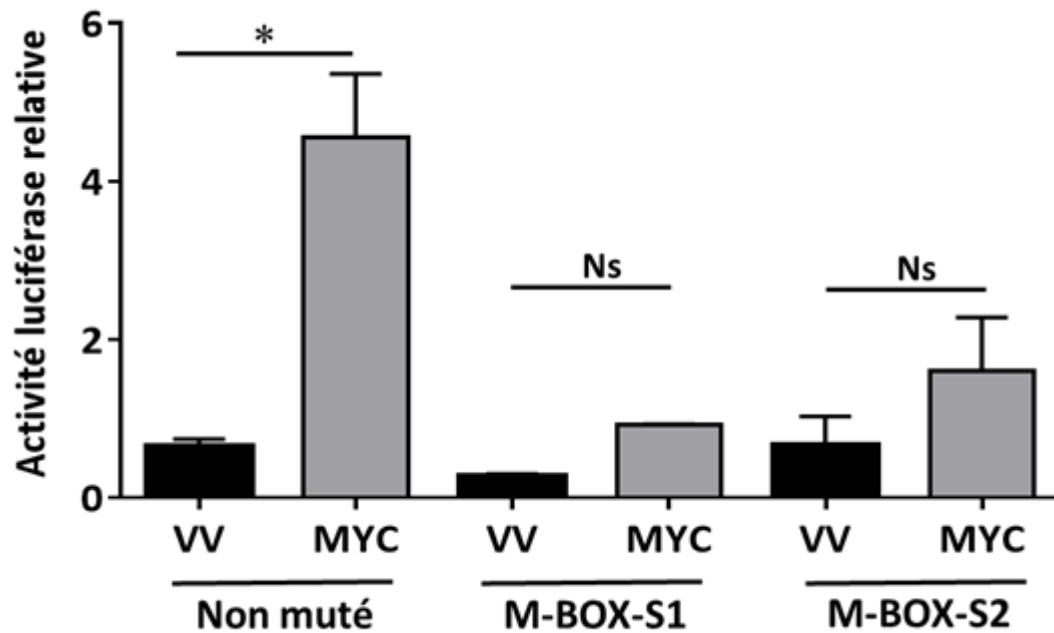


Figure 17. MYC contrôle le promoteur du gène *ITGA1* au niveau de deux éléments de réponse. Les cellules 293T ont été transfectées soit par le vecteur *pLightSwitch-Prom* comportant le gène Renilla couplé au promoteur du gène *ITGA1* non muté, soit incluant la mutation du site BOX-S1 (M-BOX-S1) ou la mutation du site BOX-S2 (M-BOX-S2). Pour chaque condition, les activateurs étaient soit le vecteur vide (VV), soit le vecteur d'expression de MYC. L'activité du promoteur a été déterminée par la mesure de l'activité de la Renilla et le résultat a été exprimé par rapport au vecteur vide. Le vecteur d'expression de la Luciférase (*firefly*) a été utilisé comme contrôle de la transfection dans toutes les conditions. Les expériences ont été réalisées à trois reprises, chaque fois en triplicata. Test Student, * $P < 0.05$. Ns : non significatif. Adapté de (Boudjadi et al., 2015).

4.6. Contrôle de l'expression du gène *ITGA1* par le facteur de transcription MYC dans le cancer colorectal :

Il est important de savoir que même si les essais luciférase apportent beaucoup d'information sur l'activité des promoteurs en permettant d'effectuer différents tests comme la mutagenèse dirigée, ils restent tout de même artificiels puisque les promoteurs sont montés dans des plasmides et que la structure de ces segments d'ADN n'inclut pas les autres composants de la chromatine que l'on retrouve dans l'ADN génomique des cellules.

Dans le contexte du CCR, nous avons tout d'abord étudié le contrôle du promoteur du gène *ITGA1* par MYC dans différentes lignées coliques colorectales. Pour cela, nous avons choisi les lignées HT29, T84 et SW480 qui expriment MYC et *ITGA1* (tableau XII). D'une part, le traitement de ces trois lignées par un inhibiteur spécifique de MYC à 50 μ M, le 10058-F4, entraîne une baisse de l'expression protéique de MYC et une réduction de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ au niveau du transcrit et de la protéine (figure 18 A-B), alors que l'expression de la sous-unité $\beta 1$ était faiblement affectée. D'autre part, la répression de l'expression de MYC par un sh-ARN ciblant l'ARN messager de *MYC* dans la lignée HT29, entraîne une baisse de l'expression du messager de *MYC* et celle du gène *ITGA1*, sans effet significatif sur l'expression du gène *ITGB1* (figure 19 A-B)

Lignée cellulaire	MYC (protéine)	<i>ITGA1</i> (transcrit)	Sous-unité $\alpha 1$ (protéine)
Caco 2/15	+/-	+	++
HCT116	++	+/-	+/-
DLD1	+	+/-	+/-
HT29	++	++	++
SW480	++	++	++
SW620	+	+	+
T84	+	+	+

Tableau XII. Évaluation de l'expression de MYC (protéine) et le messager (*ITGA1*) et la protéine de la sous-unité $\alpha 1$ dans différentes lignées cancéreuses colorectales. Modifié de (Boudjadi et al., 2015).

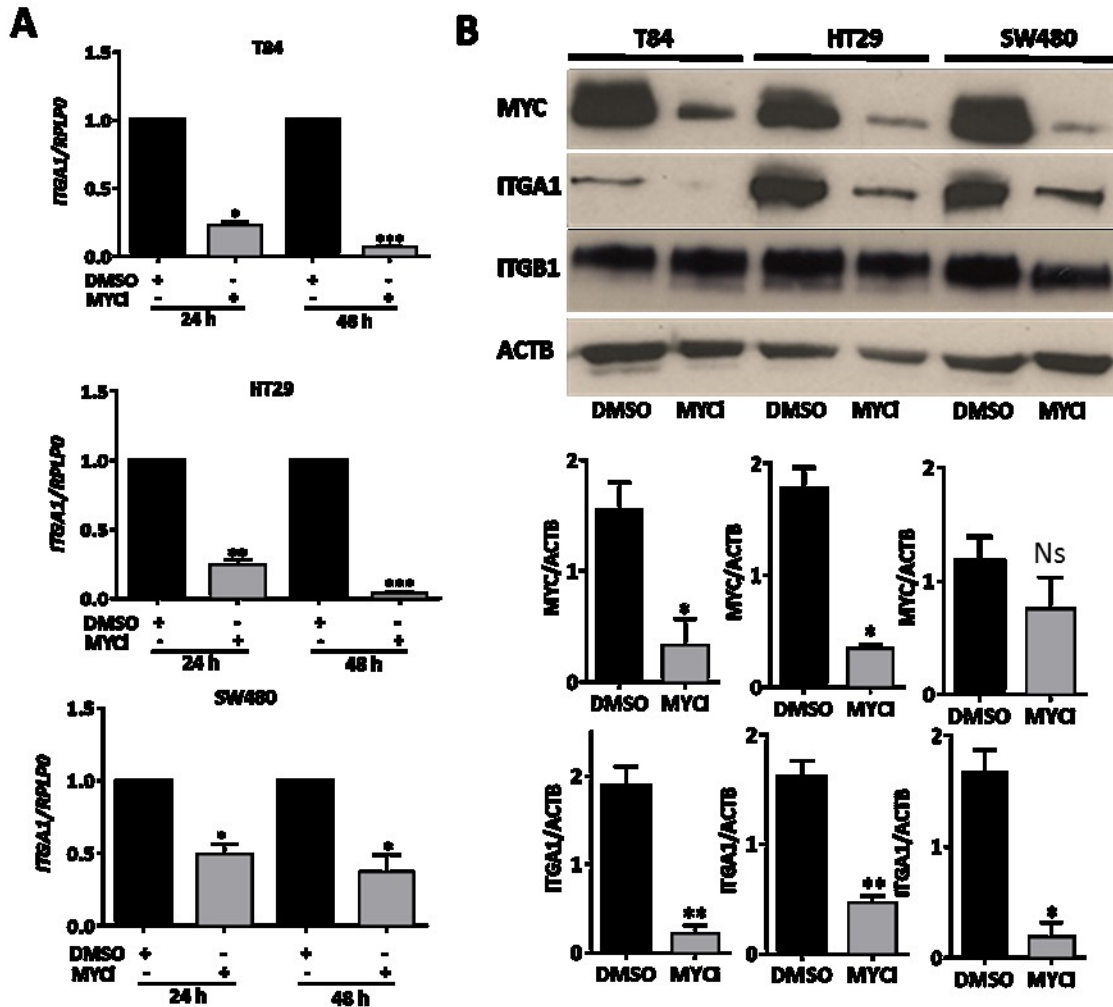


Figure 18. L'inhibition de MYC entraîne une baisse de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les cellules cancéreuses colorectales. **A.** Les cellules T84, HT29 et SW480 ont été traitées pendant 24h ou 48 heures soit avec le 10058-F4, un inhibiteur de MYC (MYCi), à la concentration de 50 μ M dilué dans le DMSO, soit avec le DMSO seulement. Les niveaux de l'ARNm du gène *ITGA1*, déterminés par qPCR, sont exprimés en degré de variation rapporté au contrôle (=1) et sont normalisés à l'expression du gène *RPLP0*, utilisé comme gène endogène. **B.** Immunobuvardage représentatif et analyse densitométrique de l'expression de MYC, *ITGA1* et *ITGB1* après traitement des cellules T84, HT29 et SW480 comme indiqué dans (A). L'expression de la bêta-actine (*ACTB*) a été utilisée comme contrôle du chargement. Toutes les expériences ont été effectuées en triplicata et répétées à trois reprises. Test Student, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. Ns : non significatif. Adapté de (Boudjadi et al., 2015)

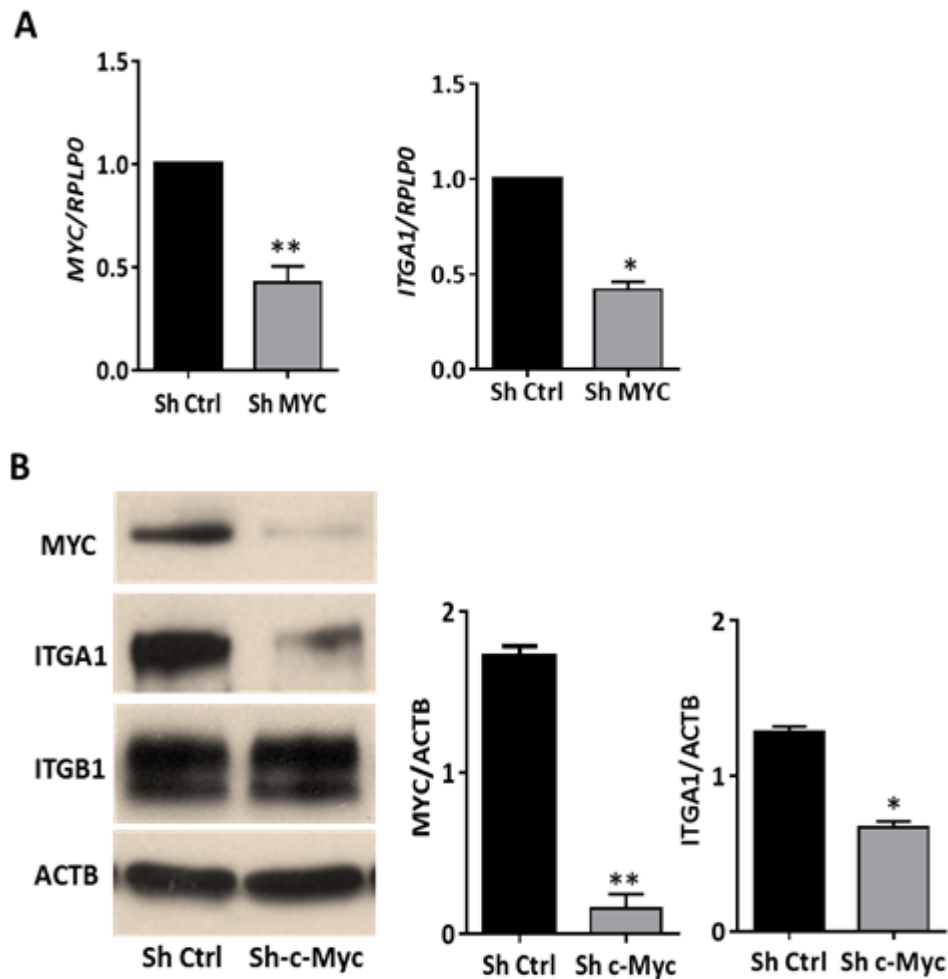


Figure 19. La répression de l'expression de MYC induit une réduction de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les cellules cancéreuses colorectales. Les cellules HT29 ont été infectées soit avec des lentivirus comportant des sh-ARNs réprimant l'expression de l'ARNm de MYC (sh c-MYC) soit des sh-ARN contrôle (sh-Ctrl) non ciblant. **A.** L'expression des transcrits de *MYC* et *ITGA1* a été quantifiée par qPCR et rapportée à l'expression du gène endogène *RPLP0*. **B.** Immunobuvardage représentatif et analyse densitométrique de trois expériences indépendantes montrant l'expression des protéines MYC, $\alpha 1$ et $\beta 1$ (sans densitométrie) ainsi que la bêta-actine, utilisée comme contrôle du chargement des protéines. Test Student, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Adapté de (Boudjadi et al., 2015).

Pour confirmer que le contrôle de l'expression du gène *ITGA1* par le facteur de transcription MYC se fait de façon directe dans les cellules cancéreuses colorectales, nous avons procédé par immunoprécipitation de la chromatine dans le but de vérifier si MYC se lie directement au niveau de la région du promoteur du gène *ITGA1* qui comporte les ERs que nous avons préalablement identifiés. Comme contrôle positif, nous avons utilisé le promoteur du gène *CCND1*, car ce promoteur comporte un élément E-box. Le gène *CCND1* code pour la cycline D1 qui est une cible bien connue du facteur MYC (Francoeur et al., 2009; Yang et al., 2009). Dans cette expérience nous avons observé que l'utilisation des anticorps anti c-Myc entraîne un enrichissement de la région de la chromatine du promoteur du gène *CCND1* ainsi que la région du promoteur du gène *ITGA1* comportant les deux éléments de réponses pour MYC, que nous avons identifiés (figure 20, A et C). Le fait qu'un facteur de transcription se lie sur un promoteur n'indique pas nécessairement qu'il s'agit d'un effet répressif ou une induction de l'expression. Nous avons amplifié par qPCR les mêmes segments des promoteurs des gènes *ITGA1* et *CCND1* en utilisant des anticorps anti ARN-POLII pour confirmer le recrutement de l'ARN polymérase dans les mêmes conditions que MYC dans la lignée HT29. L'utilisation de ces anticorps entraîne une augmentation de l'enrichissement de la chromatine des régions cibles sur les promoteurs des deux gènes *ITGA1* et *CCND1*, suggérant que la machinerie transcriptionnelle a été engagée sur les deux promoteurs pendant la liaison du facteur de transcription MYC sur ces promoteurs (figure 20, B et D).

Combiné ensemble nos résultats suggèrent que MYC est un régulateur transcriptionnel du gène *ITGA1* dans le CCR.

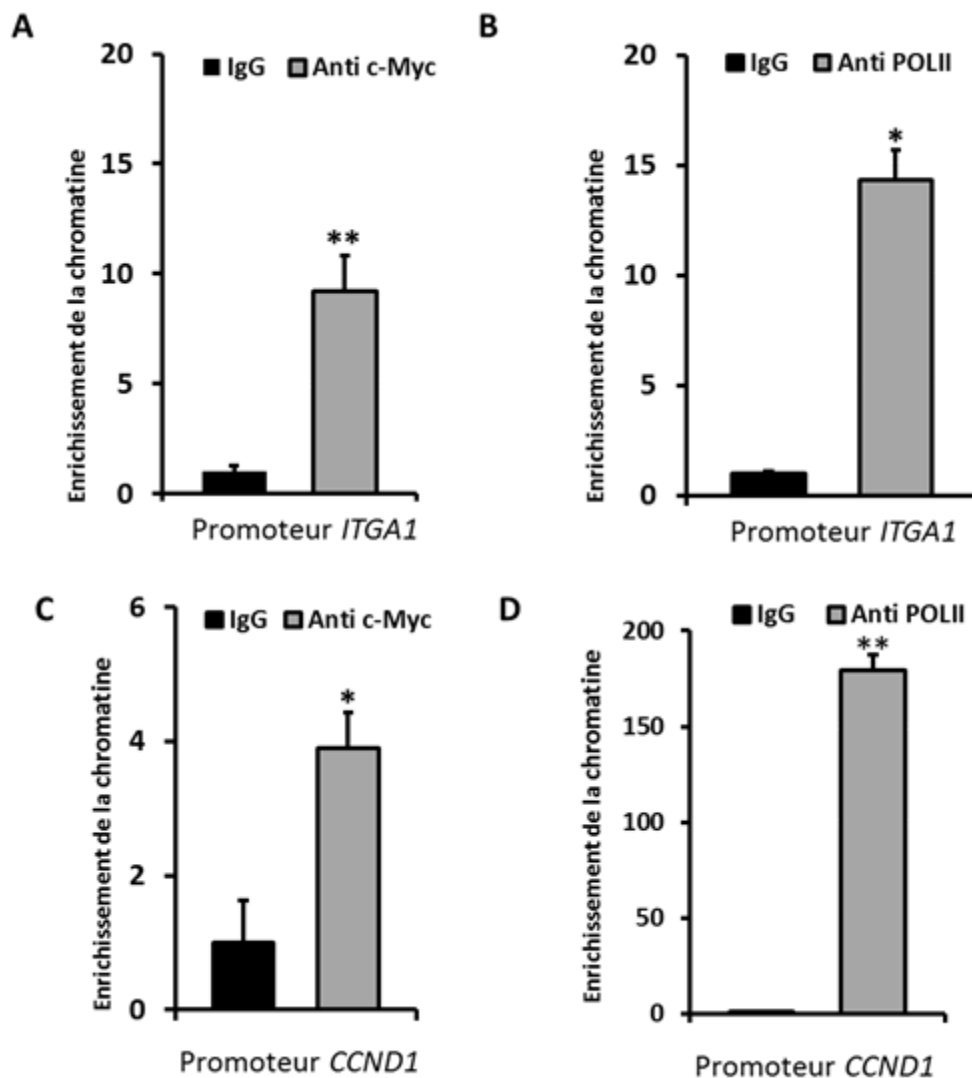


Figure 20. Identification, par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), de l'occupation du promoteur de la sous-unité $\alpha 1$ par MYC dans la lignée tumorale colique HT29. L'expérience a été réalisée soit avec les anticorps anti-c-Myc, anti POLII ou anti IgG (Non spécifiques), ce dernier a été utilisé comme contrôle négatif. **A-B.** L'enrichissement de la région du promoteur du gène *ITGA1* comportant les deux éléments de réponse BOX-S1 et BOX-S2 a été quantifié par qPCR en comparaison à une région de la chromatine ne comportant pas d'élément de réponse pour MYC. **C-D.** L'enrichissement de la région du promoteur de la cycline D1 (*CCND1*), comportant un élément consensus E-box, a été utilisé comme contrôle positif de l'expérience. Les résultats sont présentés comme des moyennes avec erreur type, et les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, et les qPCR ont été effectués en triplicata. Test Student, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Adapté de (Boudjadi et al., 2015).

4.7. Expression de MYC et la sous-unité $\alpha 1$ dans le cancer colorectal :

Après avoir démontré que MYC contrôle l'expression du gène *ITGA1* dans les cellules tumorales colorectales, nous avons par la suite évalué leur expression dans les tissus de cancer colorectal et déterminé si une corrélation existe entre ces deux protéines. Comme nous avons observé que la sous-unité $\alpha 1$ est présente dans les cellules épithéliales tumorales et les cellules du stroma et que MYC est exprimé en majorité par les cellules tumorales, nous avons donc étudié son expression et celle de MYC en immunohistochimie seulement dans les cellules épithéliales. L'étude a porté sur les 65 adénocarcinomes et leurs marges de résection respectives. Les scores utilisés pour l'analyse semi-quantitative de l'expression de MYC étaient les mêmes que pour $\alpha 1$, étant donné que les deux protéines ont le même profil d'expression dans la crypte de la muqueuse colique normale. De ce fait, un score de 1 (expression modérée) a été attribué aux tumeurs qui expriment MYC et $\alpha 1$ avec une intensité équivalente à celle des cellules épithéliales du fond de la crypte colique, alors qu'un score de 0 (expression faible a absente) été attribué aux tumeurs exprimant MYC et $\alpha 1$ de façon comparable à la partie supérieure de la crypte et à l'épithélium de surface. Un score de 2 a été attribué aux tumeurs où l'expression de MYC et $\alpha 1$ est plus intense par rapport aux cellules du fond de la crypte. Comme illustré dans la figure 21, MYC est présent dans les noyaux des cellules du fond de la crypte et son expression est faible dans la partie haute de la crypte et absent dans l'épithélium de surface (figure 21A). La sous-unité $\alpha 1$ est exprimée, au pôle basolatéral des cellules épithéliales normales de façon comparable à l'expression de MYC dans cet épithélium (figure 21C). Dans les tumeurs présentées dans la figure 21 on observe que lorsque MYC est fortement exprimé dans le noyau des cellules tumorales colorectales, $\alpha 1$ l'est également dans les mêmes tumeurs (figure 20, comparer B et D, F et H, J et L), alors que l'absence de MYC est accompagnée par l'absence de la sous-unité $\alpha 1$ (Figure 20, comparer N et P). Dans toutes les tumeurs colorectales étudiées, nous avons observé que MYC est présent dans 34 tumeurs (52%) et $\alpha 1$ dans 42 tumeurs (65%) et qu'il existe une corrélation significative entre l'expression de MYC et celle de la sous-unité $\alpha 1$ dans 72,3%

des cas (Tableau XIII, κ pondéré de 0,7, $P < 0,0001$). Tous comme pour les lignées cellulaires colorectales, cette analyse immunohistochimique semi-quantitative supporte l'hypothèse que MYC est impliqué dans la régulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines, dans les adénocarcinomes colorectaux.

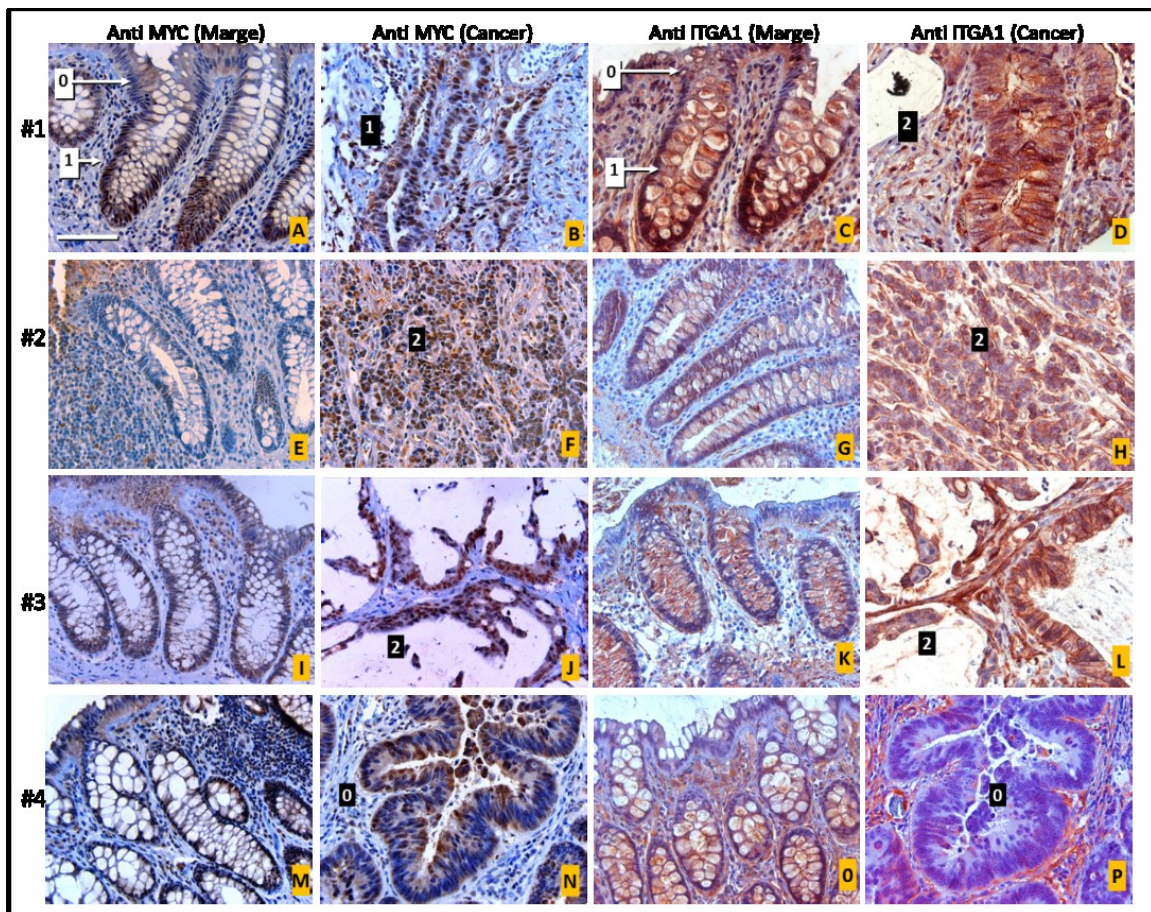


Figure 21. Images d'immunohistochimie représentatives de l'expression de MYC et de la sous-unité $\alpha 1$ dans les adénocarcinomes colorectaux et les marges appariées.

L'immunohistochimie a été réalisée sur des lames de TMA comportant des échantillons de chaque cancer et sa marge issus de 65 patients, comme décrit dans la section matériels et méthodes. Des images de la tumeur et la marge de résection de 4 patients (1-4) sont illustrées dans la figure. Pour le patient 1 (Ligne 1), l'intensité d'expression de MYC avait un score de 1 (B, cadran noir) car similaire à son expression dans le fond de la crypte au niveau de la marge de résection (A, score 1, cadran blanc) alors que le score d'expression de la sous-unité $\alpha 1$ était de 2 car plus intense dans la tumeur (D, score 2, cadran noir) par rapport à la marge de résection (A, score 1, cadran blanc). Pour les patients 2 et 3, le score de 2 a été attribué à la forte intensité d'expression de MYC et de la sous-unité $\alpha 1$ dans les tumeurs (F et H, carré noir). Pour le patient 4, l'intensité de l'expression des deux protéines avait un score de 0 (N et P, score 0, cadran noir) car elle était comparable à leur expression dans la partie supérieure de la crypte et de l'épithélium de surface (M et O). Pour les deux protéines, les scores de référence correspondant soit à leur expression faible ou négative dans la partie haute de la crypte et l'épithélium de surface (Score 1, cadran blanc), ou soit à leur expression dans le fond de la crypte (Score 1, cadran blanc) sont indiqués dans les images de la marge de résection du patient 1 (A et C). Les cadrans noirs comportent les scores attribués aux tumeurs et les cadrans jaunes indiquent l'identification de chaque image. La barre blanche dans l'image A correspond à une échelle de 100 μm . Adapté de (Boudjadi et al., 2015).

		Score de MYC			Total
		0	1	2	
Score de ITGA1	0	21	2	0	23
	1	8	15	1	24
	2	2	5	11	18
	Total	31	22	12	65

Tableau XIII. Corrélation entre l'expression de MYC et de la sous-unité $\alpha 1$ dans les adénocarcinomes colorectaux. Comparaison entre l'expression immunohistochimique de MYC et de la sous-unité $\alpha 1$ dans les tumeurs. Les scores de 0, 1 et 2 ont été attribués aux tumeurs en fonction de l'intensité de l'expression des deux protéines. En rouge sont le nombre des tumeurs de patients pour lesquelles les scores de MYC et $\alpha 1$ sont identiques. L'expression de la sous-unité $\alpha 1$ corrèle à celle de MYC dans 72,3% des tumeurs étudiées (47 cas, $\kappa=0,7$, $P<0,0001$). Adapté de (Boudjadi et al., 2015).

4.8. Implication de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans la progression du cancer colorectal :

Dans cette étude la sous-unité $\alpha 1$ était présente dans 65 % des tumeurs colorectales étudiées et dans 6 lignées tumorales colorectales parmi lesquelles HT29, SW480 et T84 qui en expriment le plus et pour lesquelles le profil des mutations oncogéniques est différent. Pour étudier les rôles de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans le cancer colorectal nous avons opté pour la stratégie de perte de fonction par la répression de l'expression de l'ARNm du gène *ITGA1* dans ces trois lignées. Cette répression a été validée par qPCR pour le transcrit et en immunobuvardage au niveau protéique (figure 22, A et B). Il est à noter qu'il n'y avait pas une modulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ dans les trois lignées (figure 22B). Comme l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est connue pour son implication dans la prolifération des cellules endothéliales (Abair et al., 2008), des fibroblastes (Giancotti 2000) et pour les cellules carcinomateuses pulmonaires du modèle murin (Macias-Perez et al., 2008), nous avons testé l'effet de la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ sur la prolifération des cellules cancéreuses colorectales. Comme illustré dans la figure 23, il y avait une baisse significative de la croissance cellulaire jusqu'à 8 jours après ensemencement des cellules, reflétée par une courbe de croissance plus basse dans le groupe des cellules sh- $\alpha 1$ par rapport au groupe sh-Ctrl pour les trois lignées HT29, T84 et SW480 (figure 23A). Cette baisse était en rapport avec la diminution de la prolifération cellulaire telle que démontrée par la diminution significative de l'incorporation du BrdU dans les cellules sh- $\alpha 1$ par rapport aux cellules sh-Ctrl (figure 23B). La différence de l'incorporation du BrdU entre les deux groupes de cellules était de 9,37%, 16,4% et 9,59% respectivement pour les lignées HT29, T84 et SW480. Ces résultats suggèrent que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est importante pour la prolifération des cellules cancéreuses colorectales.

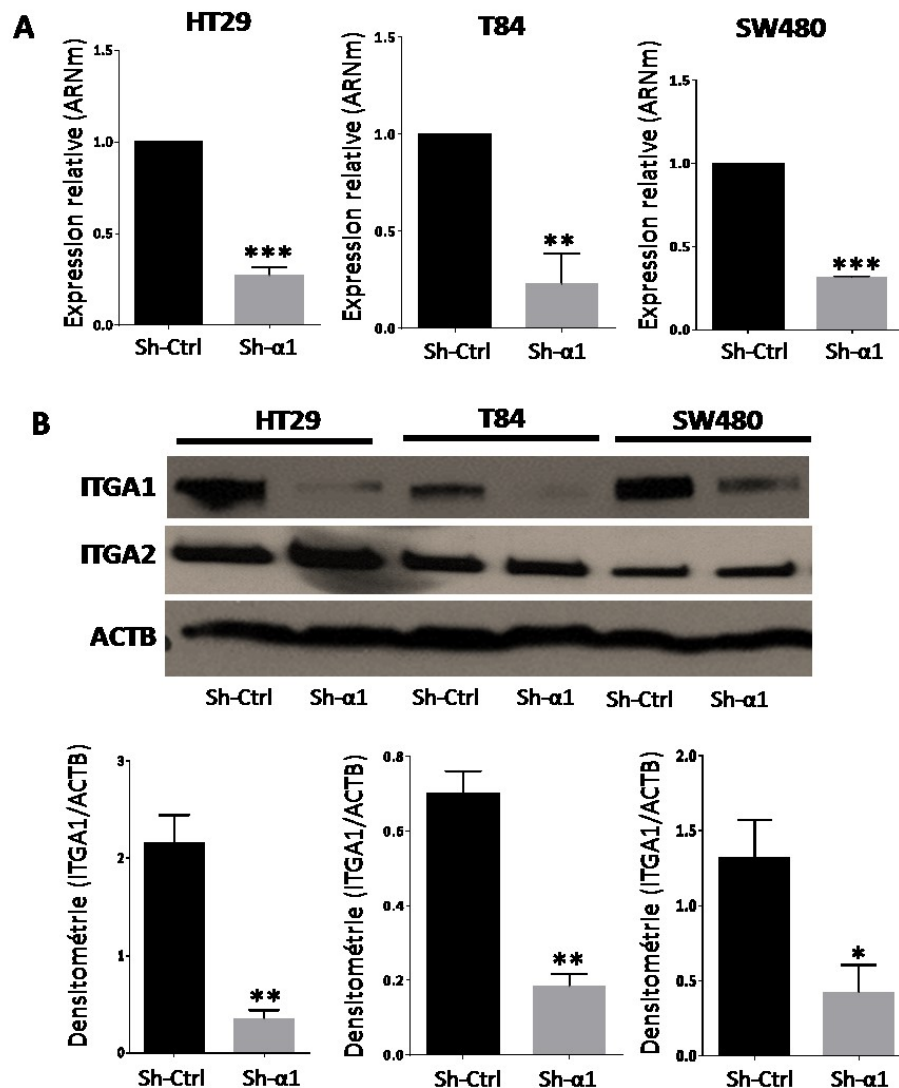


Figure 22. Répression de l'expression de la sous-unité α 1 dans les cellules cancéreuses colorectales. Les cellules HT29, T84 et SW480 ont été infectées avec des lentivirus comportant soit des sh-ARNs réprimant l'expression de l'ARNm du gène *ITGA1* (sh- α 1) soit des sh-ARN contrôles (sh-Ctrl) non ciblant. **A.** L'expression du transcrite du gène *ITGA1* a été quantifiée par qPCR et rapportée à l'expression du gène endogène RPLP0. **B.** Immunobuvardage représentatif et analyse densitométrique (excluant la sous-unité α 2) de l'expression de la sous-unité α 1 et α 2 dans les cellules sh- α 1 par rapport aux cellules sh-Ctrl. L'expression de la β -actine (ACTB) a été utilisée comme contrôle du chargement des protéines. Test de Student * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

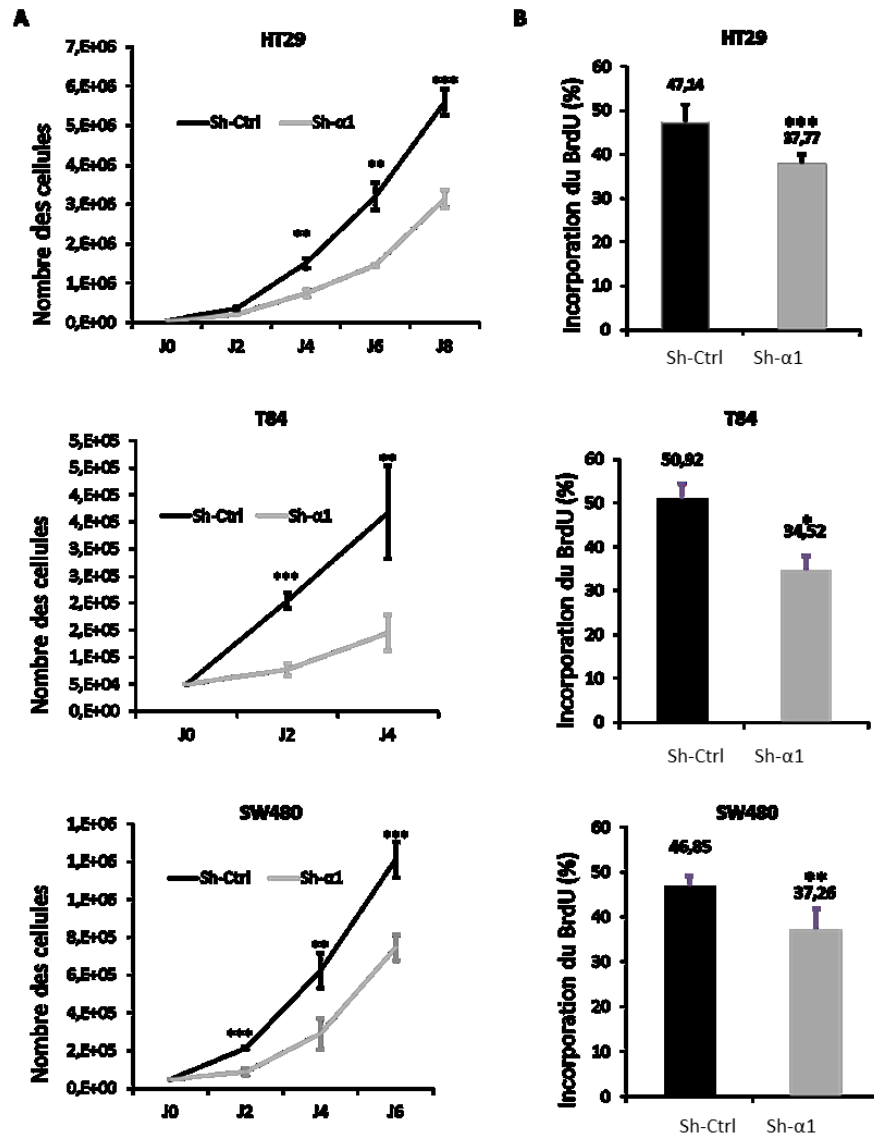


Figure 23. Implication de l'intégrine $\alpha1\beta1$ dans la prolifération des cellules cancéreuses colorectales. **A.** Courbe de croissance des trois lignées cancéreuses HT29, T84 et SW480. Les courbes montrent le nombre des cellules vivantes suivant le temps, entre les deux groupes sh-Ctrl en noir et sh- $\alpha1$ en grils pâle. Au départ, 50000 cellules ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits, et le compte a été effectué tous les deux jours. **B.** Histogrammes illustrant le pourcentage d'incorporation du BrdU effectuée 4 jours après ensemencement des cellules HT29, T84 et SW480, pour les groupes Sh-Ctrl et Sh- $\alpha1$. Le compte représente le pourcentage des noyaux marqués par rapport à la totalité des noyaux présents dans chaque champ analysé. Les expériences ont été réalisées en triplicatas, et répétées trois fois. Test de Student. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Comme les intégrines sont importantes pour la métastase des cellules cancéreuses (Sterry et al., 1992; Gogali et al., 2004; Desgrosellier et Cheresch 2010), et que la résistance à l'anoïkose est une condition primordiale pour que les cellules tumorales puissent résister à la perte d'adhérence, nous avons évalué l'importance de l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ pour cette fonction. Nous avons observé que la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ rend les cellules HT29 et T84 plus sensibles à l'anoïkose par rapport au sh-Ctrl, comme le montre l'augmentation de l'activité de la Caspase 3 (figure 24). Pour la lignée SW480, le test statistique a montré un $p=0,06$, proche du seuil de significativité qui est de 0,05. Des expériences supplémentaires pourraient confirmer cette tendance.

Il est bien connu que les intégrines sont des acteurs importants dans la migration cellulaire et notamment pour les cellules cancéreuses, dont celles du cancer colorectal. (Klekotka et al., 2001; Vicente-Manzanares et al., 2005; Song et al., 2015). Pour vérifier si l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ est impliquée dans la migration des cellules cancéreuses colorectales, nous avons réalisé un test de blessure sur Pétri (figure 25A) en abolissant la prolifération cellulaire par l'hydroxyurée 24 heures avant l'expérience et tout au long du test. Comme illustré dans la figure 25B, la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ entraîne un retard de la fermeture de la blessure par rapport au contrôle, pour les deux lignées HT29 et T84. En effet pour la lignée HT29, 48 heures après la blessure, le rapport surface initiale/surface finale était de 4,11 pour les cellules sh-Ctrl et 1,63 pour les cellules sh- $\alpha 1$. Pour la lignée T84, ce rapport était de 11,12 pour les cellules sh-Ctrl et 2,53 pour les cellules sh- $\alpha 1$ (figure 25C). Ces données indiquent qu'il y avait un retard de migration dans les cellules sh- $\alpha 1$ par rapport aux cellules sh-Ctrl, suggérant un rôle positif de l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ dans la migration des cellules cancéreuses colorectales.

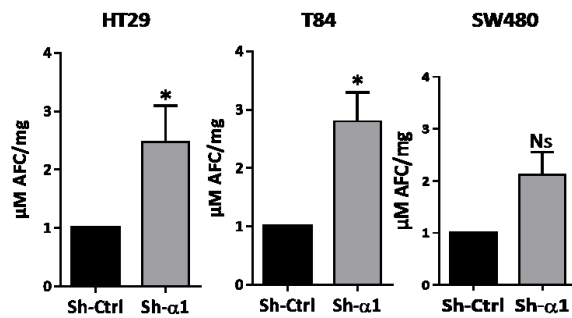


Figure 24. Implication de l'intégrine $\alpha1\beta1$ dans la résistance à l'anoïkose dans le cancer colorectal. Histogrammes montrant le résultat du dosage de l'activité de la caspase 3 dans les trois lignées HT29, T84 et SW480. Les cellules ont été maintenues en suspension pendant 24 heures dans des Pétris recouverts de poly-Hema. Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA sans PNPP. N=3. Test de Student. *P<0,05. Ns= non significatif.

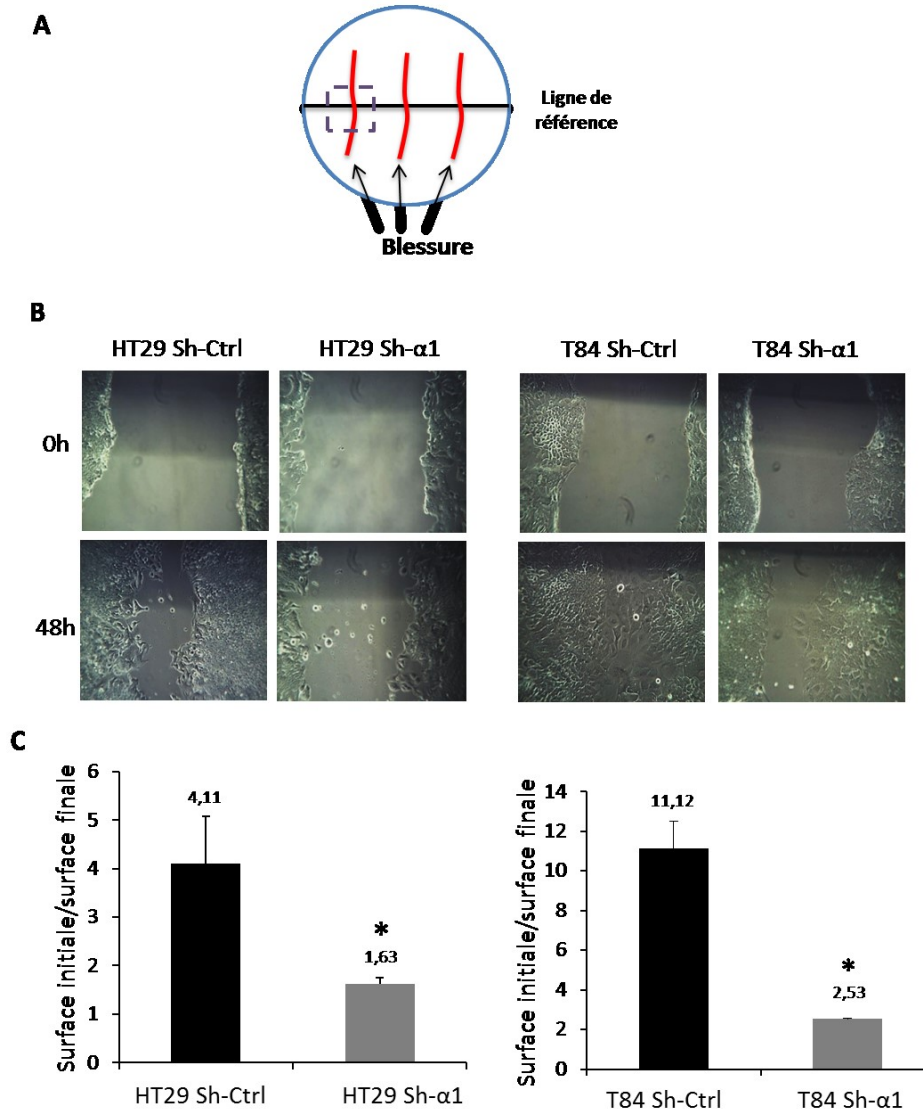


Figure 25. Rôle de l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ dans la migration cellulaire. **A.** Schéma représentatif du test de blessure réalisé. Les cellules, ensemencées à haute densité, ont été traitées par l'hydroxyurée (2 μ M) pendant 24 heures avant le test. Deux à trois blessures ont été faites dans chaque Pétro (lignes rouges), et une ligne horizontale (en noir) a été tracée sous le Pétro pour servir de repaire lors de la prise des photos (cadre) au fil du temps. **B.** Images représentatives du test de blessure pour les deux lignées HT29 et T84. La fermeture de la blessure est comparée entre les groupes sh- $\alpha 1$ et sh-Ctrl, entre 0h et 48 heures pour chaque lignée. **C.** Histogramme montrant le résultat du rapport de surface initiale créée par la blessure (0h) par rapport à la surface finale (48h). Les expériences ont été effectuées en triplicata et ont été répétées à trois reprises. Test t de Student. * $P < 0,05$.

Afin de tester l'effet de la perte de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ sur la capacité tumorigénique des cellules cancéreuses colorectales, un nombre équivalent de cellules sh- $\alpha 1$ et sh-Ctrl (T84 et HT29) a été injecté dans le tissu sous cutané des souris immunodéficientes nu/nu. Après exérèse des tumeurs, leur morphologie a été analysée. Comme le montre la figure 26A, il n'y avait pas de différence significative entre la morphologie des cellules tumorales issues des cellules HT29 sh- $\alpha 1$ et sh-Ctrl. Pour la lignée T84, les cellules sh- $\alpha 1$ sont de plus petite taille par rapport aux cellules sh-Ctrl qui sont d'aspect cylindrique par endroits et avec une faible muco-sécrétion. La répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ a été validée par immunohistochimie et par immunobuvardage (figure 26, B et C). La baisse de la prolifération observée *in vitro*, s'est reflétée *in vivo* dans les tumeurs issues des cellules sh- $\alpha 1$ par rapport aux tumeurs issues des cellules sh-Ctrl, pour les deux lignées HT29 et T84, comme le montre la courbe de croissance mesurant le volume tumoral sur 30 jours après injection des différents groupes de cellules dans le tissu sous cutané des souris (figure 26D). L'examen histologique des tumeurs, issues de la lignée HT29, a montré que le nombre des mitoses était significativement plus faible dans les tumeurs issues des cellules sh- $\alpha 1$ (en moyenne 9 mitoses par mm^2), par rapport aux tumeurs sh-Ctrl (en moyenne 19 mitoses par mm^2) (figure 27, A et B), ce qui concorde avec la baisse de la prolifération observée *in vitro*. De plus, les tumeurs issues des cellules sh- $\alpha 1$ comportaient significativement moins de vaisseaux par rapport aux tumeurs développées à partir des cellules HT29 sh-Ctrl. En moyenne le nombre des capillaires dans les tumeurs HT29 sh-Ctrl était de 6,2/ mm^2 alors que ce nombre était de 2,2 dans les tumeurs sh- $\alpha 1$ (figure 27, C et D). Les capillaires sanguins ont été détectés par les anticorps dirigés contre l'antigène CD31, exprimé à la surface des cellules endothéliales. D'autre part, il y avait de larges plages de nécrose significativement plus grandes dans les tumeurs sh- $\alpha 1$ par rapport aux petites plages de nécrose observées dans les tumeurs issues des cellules sh-Ctrl (figure 27E). La nécrose représente 11% de la surface tumorale pour les tumeurs sh-Ctrl, alors qu'elle occupe 32% de la surface des tumeurs sh- $\alpha 1$ (figure 27F). Il s'agit ici d'une nécrose à limites nettes, typiquement observée dans les zones ischémiques. Ensemble, ces constatations expliqueraient la petite taille des tumeurs sh- $\alpha 1$ par rapport

aux tumeurs contrôle, et suggèrent un rôle de l'intégrine $\alpha1\beta1$ dans la progression du cancer colorectal.

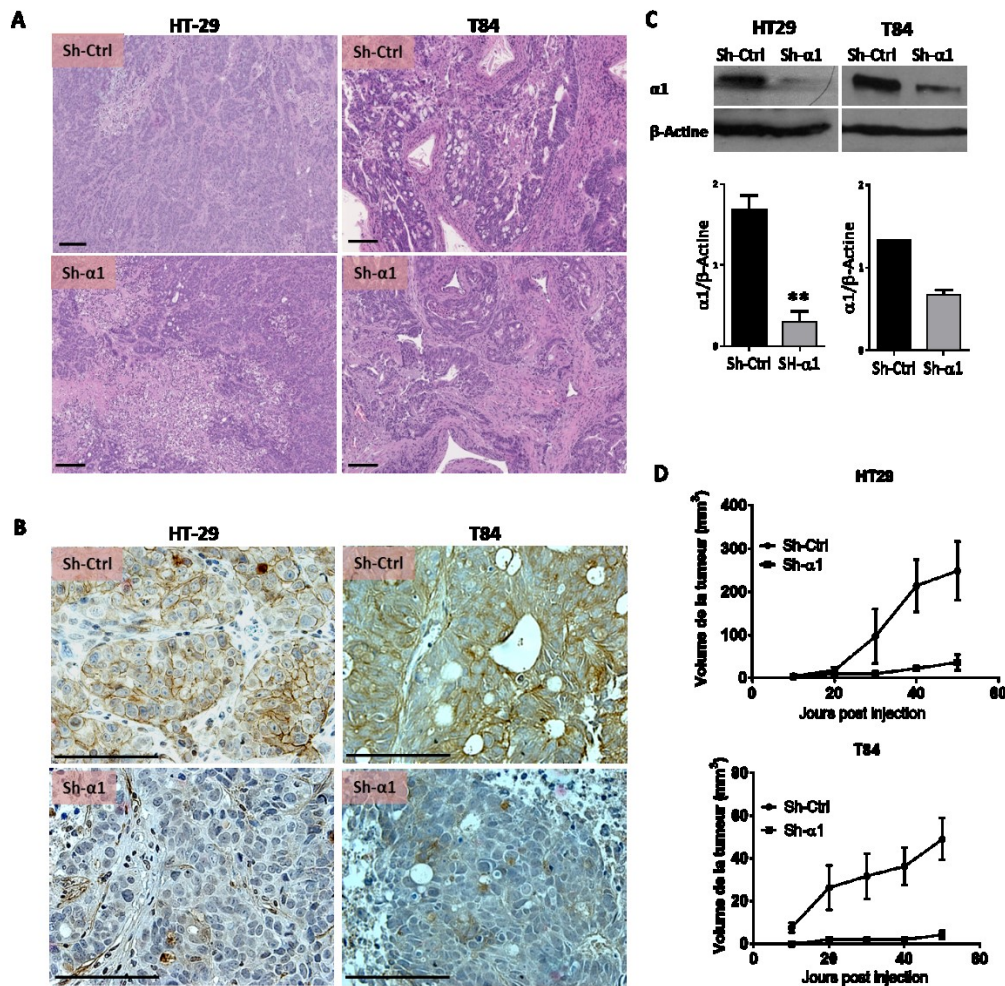


Figure 26. La réduction de l'expression de la sous-unité $\alpha1$ réduit le développement des tumeurs colorectales en xénogreffes. **A.** Images représentatives de l'architecture histologique des tumeurs issues des cellules sh-Ctrl et sh- $\alpha1$ pour les deux lignées HT29 et T84. Les tumeurs HT29 sh- $\alpha1$ comportent des plages de nécrose étendues. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. **B et C.** Images d'immunohistochimie et immunobuvardage représentatifs de la validation de la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha1$ après exérèse des tumeurs issues des cellules sh- $\alpha1$ et sh-Ctrl pour les deux lignées HT29 et T84. **D.** Courbes montrant l'évolution du volume tumoral dans les xénogreffes issues des cellules HT29 et T84. Les tumeurs ont été mesurées selon deux axes et le volume déterminé selon la formule $[V = (d^2 \times D) \times 0.5]$. N=4. Test t de Student. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Barre = 100 μ m.

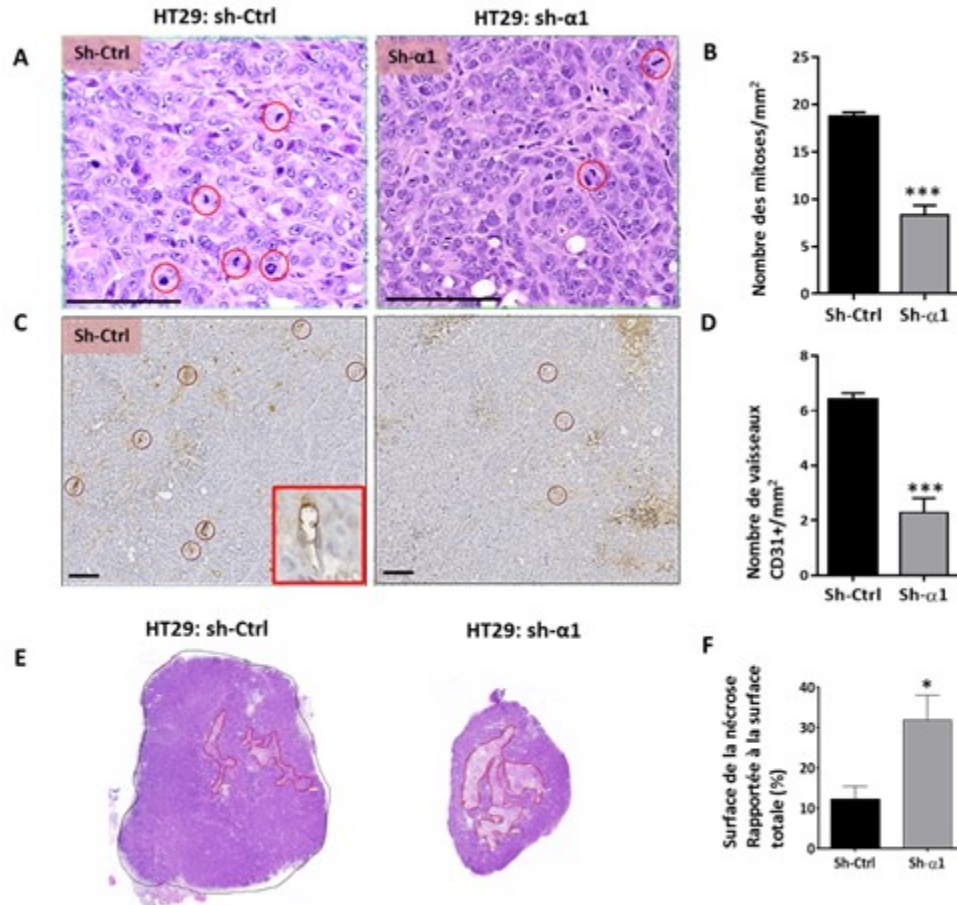


Figure 27. La répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ entraîne une baisse du nombre des mitoses, des vaisseaux sanguins et une augmentation de la nécrose dans les xénogreffes. **A.** Images représentatives de coupes de tumeurs, issues de cellules HT29 sh-Ctrl et sh- $\alpha 1$, colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les mitoses sont entourées par un cercle rouge. **B.** Histogramme montrant le compte du nombre des mitoses par mm² dans les deux groupes de tumeurs sh-Ctrl et sh- $\alpha 1$. **C.** Images d'immunohistochimie montrant les capillaires intra-tumoraux entourés par un cercle rouge. Les cellules endothéliales des capillaires ont été marquées par les anticorps anti-CD31 tel qu'illustré dans l'encadré rouge. **D.** Résultat du compte du nombre des capillaires dans les tumeurs contrôles et sh- $\alpha 1$. **E.** Image de deux tumeurs sh-Ctrl et sh- $\alpha 1$, coupées selon le plus grand axe et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les zones éosinophiles délimitées en rouge correspondent à la zone de nécrose dans chaque tumeur. **F.** Histogramme présentant le résultat du pourcentage des zones nécrotiques par rapport à la surface totale de chaque tumeur. Les résultats représentent la moyenne de l'analyse de trois échantillons. Test t de Student. *P<0,05, ***P<0,001. Barre =100 μ m.

5. Discussion

5.1. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans le cancer colorectal :

Les intégrines constituent une superfamille de récepteurs transmembranaires qui assurent l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire mais aussi la régulation de plusieurs fonctions cellulaires comme la transcription des gènes, la différenciation, la prolifération, la survie cellulaire et la migration (Giancotti 2000; Luo et al., 2007; Vachon 2011). Du fait de l'importance de ces fonctions pour les cellules cancéreuses, il est donc évident que de nombreuses intégrines soient exprimées et surexprimées dans plusieurs tumeurs chez l'humain, et notamment dans le cancer colorectal. Dans cette étude, j'ai tout d'abord confirmé que la sous-unité $\alpha 1$ est présente au niveau basolatéral des cellules épithéliales de la crypte de l'intestin grêle alors qu'elle disparaît dans les cellules différenciées de l'épithélium de la villosité, comme rapporté précédemment (Beaulieu 1992; Beaulieu 1997). J'ai confirmé que cette observation corrèle avec la diminution de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ (en messenger et en protéine) au cours de la différenciation des cellules de la lignée Caco-2/15, modèle reconnu dans l'étude de la différenciation intestinale (Vachon et Beaulieu 1992). De façon intéressante, $\alpha 1$ disparaît également dans les cellules différenciées de Paneth situées au fond de la crypte intestinale (figure 8). L'expression de cette sous-unité des intégrines est également perdue au cours de la différenciation des cellules hématopoïétiques en mégacaryocytes (Cheli et al., 2007). Ces observations suggèrent qu' $\alpha 1$ ne semble pas nécessaire aux cellules différenciées, car elle est aussi très peu exprimée voir absente dans les cellules de l'épithélium de la partie supérieure de la crypte et de la surface de la muqueuse colique, alors qu'elle est exprimée par les cellules de la zone proliférative de la crypte. La détection de la sous-unité $\alpha 1$ a été effectuée en immunofluorescence et en immunohistochimie en utilisant deux anticorps différents (l'anticorps TS2/7 ne fonctionne pas sur les coupes de tissu fixées au paraformaldéhyde) et dans des conditions de fixation différentes, ce qui augmente la spécificité du marquage obtenu. Cela a été renforcé par l'utilisation d'anticorps non spécifiques comme contrôle négatif (figure 11). Nous avons utilisé des anticorps qui reconnaissent la laminine 1, un marqueur spécifique de la membrane basilaire épithéliale

(Teller et Beaulieu 2001) dans le but de séparer le marquage dans les cellules épithéliales de celui des cellules mésenchymateuses, car j'ai observé que les myofibroblastes qui sont directement sous la membrane basilaire épithéliale expriment $\alpha 1$. Quelques fibroblastes du mésenchyme ainsi que les cellules musculaires lisses de la musculaire muqueuse expriment fortement $\alpha 1$, comme observé précédemment dans l'intestin (Beaulieu 1992). Ce profil d'expression est particulier à cette sous-unité car les autres sous-unités comme $\alpha 2$ et $\alpha 3$, bien que leur profil d'expression soit différent dans l'épithélium intestinal, sont peu ou non exprimées dans le tissu conjonctif de la muqueuse intestinale (Beaulieu 1992). Dans le cancer colorectal, j'ai observé $\alpha 1$ au niveau basolatéral des cellules différenciées et sous forme de liseré membranaire dans les cellules peu différenciées (figure 12D) mais sans corrélation significative avec le degré de différenciation des tumeurs étudiées. L'expression au niveau basolatéral dans les cellules intestinales est également observée pour d'autres sous-unités comme $\beta 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (Beaulieu 1992; Beaulieu 1997; Lussier et al., 2000). Cet aspect peut s'expliquer par l'absence de structures membranaires de séparation entre le pôle basal et le côté latéral, au contraire du pôle apical qui est séparé du pôle latéral par les jonctions serrées. Il est donc évident que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ se lie aux chaînes du collagène IV présent au niveau de la membrane basilaire épithéliale, alors qu'elle ne serait pas fonctionnelle au niveau du pôle latéral des cellules épithéliales car les espaces entre ces cellules ne comportent pas de chaînes de collagène IV, excepté une faible détection de la chaîne alpha 5 du collagène IV au niveau basolatéral des cellules épithéliales (Beaulieu et al., 1994). Il est à noter également que les intégrines ne font pas de liaisons homotypiques. Dans les zones tumorales indifférenciées, les cellules sont plus petites, arrondies, sans différenciation membranaire et sans membrane basale. Cet aspect pourrait expliquer l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans toute la membrane de ces cellules, et cela leur permettrait de se lier aux collagènes présents dans le stroma de la tumeur.

Dans l'ensemble des tumeurs colorectales étudiées, j'ai observé que l'expression du messenger et de la protéine de la sous-unité $\alpha 1$ est augmentée par rapport au tissu de la

marge de résection. L'expression de cette sous-unité a été observée dans d'autres tumeurs épithéliales, notamment le cancer de l'ovaire (Varma et al., 2005) et l'adénocarcinome bronchioloalvéolaire du poumon (Koukoulis et al., 1997). Cette expression est de concert avec le rôle pro-prolifératif de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ rapporté dans les cancers du poumon et mammaire du modèle murin (Lochter et al., 1999; Macias-Perez et al., 2008). J'ai constaté que plus de 86% des tumeurs expriment au minimum 2 fois plus (ou plus) le messenger de la sous-unité $\alpha 1$ par rapport au tissu de la marge, alors que l'expression de la protéine de cette sous-unité est constatée dans 65% des cellules épithéliales. Elle est augmentée dans seulement 57% de ces cellules par rapport à l'expression dans les cellules épithéliales de la marge de résection, dont 76% d'entre elles expriment faiblement $\alpha 1$. Une étude récente effectuée sur des TMA comportant plusieurs échantillons de cancers humains a permis de mettre au point plusieurs anticorps dont un anticorps anti- $\alpha 1$ différent de ceux que nous avons utilisés (Uhlen et al., 2015). La protéine était présente dans plusieurs tumeurs dont le cancer du pancréas, du sein, de l'ovaire, du foie, de la thyroïde et dans le cancer colorectal. Dans ce dernier, 80 % des cancers colorectaux exprimaient $\alpha 1$, et les cellules myoépithéliales et musculaires lisses étaient également marquées, ce qui rejoint nos résultats. Par contre, l'expression de l'ARNm de la sous-unité $\alpha 1$ n'a pas été rapportée dans cette étude. La différence entre l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ en protéine et en messenger que nous avons observée, s'explique simplement par le fait que l'analyse de l'expression en PCR tient compte de l'ARNm extrait de la totalité des cellules du tissu incluant les cellules non tumorales du stroma, qui elles aussi surexpriment $\alpha 1$ dans une très grande proportion. Il est à noter que le nombre de ces cellules est également augmenté dans le stroma des tumeurs étudiées par rapport au tissu conjonctif de la marge de résection. Cette différence dépend aussi du ratio cellules épithéliales tumorales/cellules non tumorales du stroma, dans chaque échantillon à partir duquel l'ARNm a été extrait. De nombreux types cellulaires sont présents dans ce microenvironnement incluant les macrophages et les fibroblastes qui, une fois activés par les cellules cancéreuses, peuvent jouer un rôle positif dans la progression et la croissance tumorales (Mendoza et Khanna 2009). En effet, les

macrophages de type M2 supportent l'angiogenèse, le remodelage de la matrice et l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire (Sica et al., 2008) de même que les fibroblastes associés au cancer qui permettent la dégradation de la MEC en sécrétant les MMPs et les μ PA; la survie des cellules carcinomateuses en sécrétant l'IGF et le HGF; et favorisent l'angiogenèse en élaborant le FGF et le VEGF (Kopfstein et Christofori 2006). Ce dernier facteur favorise l'expression et l'activation de plusieurs intégrines dont $\alpha v \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 1$ dans les cellules cancéreuses (Byzova et al., 2000). Dans les tumeurs colorectales étudiées, la présence de la sous-unité $\alpha 1$ dans les myofibroblastes et dans les cellules endothéliales est concordante avec les rôles rapportés de l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ dans la prolifération et la migration de ces deux types cellulaires (Pozzi et al., 1998; Senger et al., 2002; Gardner 2003; Abair et al., 2008; Gardner 2014). La présence de la sous-unité $\alpha 1$ dans les cellules du microenvironnement des tumeurs colorectales pourrait donc favoriser la progression de ces tumeurs.

5.2. La méthylation de l'ADN n'est pas impliquée dans la régulation de l'expression du gène *ITGA1* dans le cancer colorectal :

La méthylation de l'ADN est l'un des mécanismes de régulation épigénétique de l'expression de plusieurs gènes dans les cellules normales comme dans les cellules cancéreuses. Dans les premières, la méthylation de l'ADN est observée souvent dans les régions inter-géniques mais aussi dans les régions promotrices de certains gènes. Les cellules cancéreuses présentent une perte généralisée de la méthylation de l'ADN inter-génique avec un gain de méthylation dans de nombreux gènes qui comportent des îlots CpG (McCabe et al., 2009). Dans le cancer colorectal, la méthylation de l'ADN est un mécanisme de répression bien établi, permettant à la cellule cancéreuse de réprimer l'expression de plusieurs gènes dont *P21*, *P16* et *IGFBP7* (Brenner et al., 2005; Lin et al., 2007; Veganzones-de-Castro et al., 2012) qui comportent des éléments CpG dans leur promoteurs respectifs. Malgré le fait que le promoteur du gène *ITGA1* comporte un îlot CpG, l'expression de ce gène ne semble pas régulée par un mécanisme de méthylation de l'ADN dans le cancer colorectal, au contraire de sa répression par méthylation de son

promoteur dans le tissu hématopoïétique (Cheli et al., 2007). En effet, des études ont montré qu'il n'y a pas de la corrélation entre la présence d'un îlot CpG et l'expression d'un gène (Du et al., 2012), car le processus de méthylation est un mécanisme complexe qui fait intervenir la famille des méthyltransférases, qui comporte plusieurs variants et dont l'expression n'est pas toujours en corrélation avec les gènes méthylés (Su et al., 2010; Joensuu et al., 2015). D'autre part, j'ai observé $\alpha 1$ dans 65% des tumeurs et dans 6 lignées cancéreuses colorectales (sur un total de 8 lignées) en messager et en protéine alors que normalement si l'expression d'un gène est réprimée par un mécanisme de méthylation, il serait absent dans la plus part des lignées cancéreuses comme c'est le cas du gène *IGFBP7* (Lin et al., 2007) que j'ai utilisé comme contrôle positif lors du traitement des cellules par le 5-AZA, un agent de dé-méthylation de l'ADN bien caractérisé et largement utilisé. Suite à ce traitement dans la lignée HCT116 qui n'exprime pas *ITGA1*, le messager du gène *IGFBP7* est réexprimé mais non celui du gène *ITGA1*. La répression de l'expression du gène *ITGA1* dans la lignée HCT116 n'est donc pas dépendante de la méthylation de l'ADN. D'autres mécanismes seraient donc à l'origine de la régulation de l'expression du gène *ITGA1* dans le cancer colorectal.

5.3. Modulation de l'expression du gène *ITGA1* par le facteur de transcription MYC dans les cellules cancéreuses colorectales :

Comme $\alpha 1$ est exprimée dans les lignées cancéreuses colorectales et dans les tumeurs que nous avons étudiées, nous avons donc analysé son promoteur dans le but d'identifier des éléments de réponse pour des facteurs de transcription impliqués dans le cancer colorectal. La régulation de l'expression du gène *ITGA1* au niveau transcriptionnel a été tout d'abord étudiée dans les cellules musculaires lisses où son promoteur est régulé par les facteurs GATA6, Nkx3.2 et SFR (*serum response factor*). Ce dernier régule l'expression du gène *ITGA1* au niveau de la séquence CArG box présente sur le promoteur du gène *ITGA1* (Obata et al., 1997; Nishida et al., 2002). Parmi ces facteurs, seul GATA6 est connu pour être impliqué dans la progression du cancer colorectal (Belaguli et al., 2010) alors que SFR et Nkx3.2 n'ont pas été caractérisés dans ce cancer. Une étude avait rapporté que le facteur de transcription N-MYC, un membre de la famille MYC, réprime l'expression du

gène *ITGA1* dans les neuroblastomes mais le mécanisme de ce contrôle n'a pas été décrit (Tanaka et Fukuzawa 2008). De façon intéressante, chez la souris, N-MYC est présent uniquement au niveau des cellules différenciées des villosités intestinales (Bettess et al., 2005) où la sous-unité $\alpha 1$ est absente, comme rapporté précédemment (Beaulieu 1992) et confirmé dans cette étude. Cela suggère que N-MYC pourrait réprimer l'expression du gène *ITGA1* au niveau de ces cellules. Alors que l'expression de N-MYC n'a pas été rapportée dans le côlon, MYC a été observé dans la crypte de l'intestin grêle et du côlon de la souris et chez l'homme (Konsavage et al., 2012) ce qui rejoint nos observations. L'identification de deux éléments de réponse pour MYC sur le promoteur du gène *ITGA1*, la colocalisation des protéines MYC et $\alpha 1$ dans le côlon normal et dans les adénocarcinomes que nous avons étudiés suggèrent fortement l'implication de MYC dans le contrôle de l'expression du gène *ITGA1* dans ces tissus. En effet, nous avons tout d'abord observé que l'inhibition pharmacologique de MYC entraîne une baisse significative de l'expression du gène *ITGA1* dans trois lignées tumorales colorectales. Le 10058-F4 a été utilisé à la concentration de 50 μ M, précédemment utilisée dans d'autres études et qui s'est avérée suffisante pour entraîner l'inhibition de la fonction de MYC sans cytotoxicité (Yin et al., 2003; Huang et al., 2006; Mo et Henriksson 2006; Lin et al., 2007). En plus de l'inhibition de la fonction de MYC, le 10058-F4 a entraîné également une réduction significative de l'expression de MYC uniquement dans les lignées HT29 et T84, mais le mécanisme de cet effet n'a pas été étudié (Yin et al., 2003; Mo et Henriksson 2006; Lin et al., 2007). Cette baisse de l'expression de MYC pourrait être secondaire à une augmentation de sa dégradation, car l'expression du transcrit de *MYC* ne change pas significativement suite au traitement des cellules par le 10058-F4 (données non publiées). L'absence d'une diminution significative de l'expression de MYC dans la lignée SW480 peut être en rapport avec un effet dose dépendant spécifique à cette lignée, comme observé précédemment dans d'autres lignées cellulaires (Huang et al., 2006; Lin et al., 2007). En plus de l'effet observé avec l'inhibiteur de MYC dans les trois lignées utilisées, nous avons montré que la répression de l'expression de MYC par un sh-ARN entraîne une baisse de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans la lignée HT29, ce qui renforce les résultats

obtenus. D'autre part, l'expression du gène *ITGB1* qui code pour la sous-unité $\beta 1$ des intégrines, unique partenaire de la sous-unité $\alpha 1$ et qui comporte un élément de réponse E-box (Li et al., 2003), n'as pas été significativement modulée par l'inhibition de MYC ni par sa répression par un sh-MYC. Cela suggère que MYC joue un rôle mineur dans la régulation du gène *ITGB1* dans les cellules cancéreuses intestinales, malgré la présence de l'élément E-box sur le promoteur du gène *ITGB1*. Il est à noter que ce facteur de transcription régule $\beta 4$ dans les cellules cancéreuses colorectales (Ni et al., 2005), mais chez la souris MYC régule les promoteurs des gènes *ITGB1* et *ITGB4* dans les cellules de l'épithélium cutané et entraîne la répression de leur expression (Gebhardt et al., 2006). Ces différences suggèrent que les cibles transcriptionnelles de MYC dépendent du contexte cellulaire et de l'accessibilité de MYC aux éléments E-Box présents dans leurs promoteurs respectifs. En tenant compte de ces conditions, il était important de savoir si MYC régule directement l'expression du gène *ITGA1* sur son promoteur. La technique de l'immunoprécipitation de la chromatine nous a permis de démontrer que MYC se lie directement au promoteur du gène *ITGA1* dans la région qui comporte les deux séquences consensus que nous avons identifié, mais aussi au promoteur du gène *CCND1* connu pour être une cible de MYC dans le cancer colorectal (Takahashi et al., 2007). L'oncogène MYC est connu pour être impliqué dans la régulation d'environ 15% des gènes (Dang et al., 2006) et peut réguler des facteurs impliqués dans l'amplification de l'ADN et de l'ARN, ce qui lui a valu le titre de facteur d'amplification général de régulation indirecte de plusieurs gènes (Nie et al., 2012; Sabo et al., 2014). Directement, MYC régule plusieurs gènes impliqués dans la prolifération, la survie, migration et invasion cellulaires (Dang 2012). En effet, l'hétérodimère MYC/MAX une fois lié au promoteur recrute plusieurs facteurs de transcription généraux dont TFIIF, TFIID, p300 et TRRAP (Liu et al., 2008) qui sont importants pour le recrutement de l'ARN-POLII qui amorce le processus d'élongation (Dang 2012). Comme la présence de l'ARN-POLII sur le promoteur est un bon indicateur de l'activité d'un gène (Kim et al., 2005; Guenther et al., 2007), nous l'avons ciblé sur les promoteurs du gène *ITGA1* et celui du gène *CCND1* en utilisant des anticorps spécifiques à l'ARN-POLII. Nos résultats suggèrent fortement que ces deux promoteurs étaient dans

un état actif quand MYC y été lié. Dans les essais luciférase, le fait que la transfection de MAD a entraîné une réduction de l'activité du promoteur du gène *ITGA1* suggère que le complexe MAD/MAX se lie aux mêmes éléments de réponse que MYC sur le promoteur du gène *ITGA1*, comme décrit précédemment pour d'autres gènes (Ayer et al., 1993; Hurlin et al., 1997). Le fait que la destruction de l'un des deux éléments de réponse identifiés sur le promoteur du gène *ITGA1* ait entraîné une baisse de l'activité de ce promoteur même en présence de MYC suggère que les deux éléments sont nécessaires pour que MYC active le promoteur du gène *ITGA1*. Le premier élément que nous avons identifié est en amont du site d'initiation de la transcription, comme c'est souvent le cas au niveau des promoteurs. Il était situé entre -249 et -244 paires de bases alors que le deuxième élément était entre +26 to +31, en aval de ce site. Nos résultats concordent avec une étude qui a montré la présence de deux éléments de réponse CACGTG de part et d'autre du site d'initiation de la transcription du gène *TAF4b* (*Transcription initiation factor TFIID subunit 4B*) qui est régulé par le facteur MYC (Teye et al., 2008). D'autre part, il est à noter qu'il existe deux types de promoteurs chez les mammifères : les promoteurs à transcription localisée et ceux à transcription dispersée (Reynolds et al., 1984; Smale et Kadonaga 2003; Carninci et al., 2006; Juven-Gershon et Kadonaga 2010). Dans les premiers, la transcription commence au niveau d'un seul nucléotide ou dans une région très étroite autour de ce nucléotide, alors que pour le deuxième plusieurs sites d'initiation de la transcription peuvent exister dans une région de 50 à 100 nucléotides, comme c'est le cas du gène de l'*HMG CoA* (Reynolds et al., 1984). Ce dernier type est souvent observé dans les promoteurs riches en CpG, et ne comporte pas des motifs TATA, DPE (*downstream promoter element*) ou MTE (*motif ten element*) (Carninci et al., 2006; Sandelin et al., 2007). Il est donc très probable que la transcription dans le promoteur du gène *ITGA1*, qui comporte un îlot CpG dans la région des deux éléments de réponse que nous avons identifié, peut s'initier à partir de plusieurs sites d'initiation de la transcription en plus de celui que nous avons considéré dans notre étude, et qui a été initialement décrit dans le tissu hématopoïétique (Cheli et al., 2007). En fait, l'analyse bio-informatique du promoteur de ce gène, utilisant différents logiciels révèle l'existence de plusieurs sites

d'initiation de la transcription et la position des éléments de réponse va donc changer selon le site considéré. L'existence de plusieurs de ces sites suggère donc une possible différence selon le tissu, le type cellulaire, les facteurs de transcriptions recrutés et selon le contexte tumoral ou non. Une étude plus exhaustive du promoteur *ITGA1* pourrait faire la lumière sur l'existence de ces différents sites. Les deux E-box non canoniques que nous avons identifiées font partie de plusieurs éléments dits CANNTG qui ont été identifiés comme éléments de réponse pour le complexe MYC/MAX (Hurlin et al., 1997; Grandori et al., 2000; Oster et al., 2002; Fernandez et al., 2003). Un mécanisme similaire à celui du gène *ITGA1* a été observé dans le cancer du sein où le promoteur du gène *BRCA1* comporte deux éléments non-CACGTG et qui sont nécessaires à la liaison de MYC au promoteur de ce gène (Chen et al., 2011). D'autres part, il est à noter que les études d'analyse à haut débit, comme les Chip-seq, qui ne tiennent compte que de la séquence CACGTG dans l'analyse des promoteurs peuvent sous-estimer le nombre des cibles de MYC (Fernandez et al., 2003) et manquer certains promoteurs de gènes comme *BRCA1* et *ITGA1*. Comme c'est le cas dans ce travail, la recherche d'éléments de réponse pour MYC sur différents promoteurs, combinée à l'étude de sa liaison *in cellulo* à ces promoteurs ainsi qu'à l'effet de MYC sur l'expression des gènes cibles permettent une analyse plus complète du contrôle de MYC sur ces différentes cibles selon le contexte cellulaire.

5.4. Corrélation entre l'expression de MYC et de la sous-unité $\alpha 1$ dans le cancer colorectal

Après avoir montré le lien fonctionnel entre l'expression de MYC et son activité avec l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ dans les lignées cancéreuses colorectales, j'ai observé qu'il existe une corrélation significative entre l'expression des deux protéines MYC et $\alpha 1$ dans plus de 73% des adénocarcinomes. Ils sont tous les deux présents dans 40% des tumeurs étudiées. Il est à noter que MYC seul est présent dans 52.3 % de ces tumeurs, et $\alpha 1$ dans 65%. En fait, MYC est connu pour être présent dans le cancer colorectal (Erisman et al., 1985; Sikora et al., 1987), ce qui rejoint nos observations dans cette étude. Nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression de MYC et la différenciation des tumeurs ni avec le stade d'avancement de la maladie, comme c'est le cas pour $\alpha 1$. Une

seule étude a montré que le taux de survie est plus élevé chez les patients dont les tumeurs expriment MYC par rapport à ceux dont les tumeurs ne l'expriment pas (Toon et al., 2014). Ce résultat est en contradiction avec le fait que MYC soit une cible de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer colorectal (He et al., 1998; Myant et Sansom 2011), avec ses effets biologiques dans ce cancer (Hongxing et al., 2008; He et al., 2014) et le fait qu'il soit associé à un mauvais pronostic dans d'autres cancers comme le lymphome diffus de type B (Chang et al., 2000; Agarwal et al., 2016; de Jonge et al., 2016). Malgré le fait que MYC soit une cible connue de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer colorectal, et qu'il soit stabilisé par l'inhibition de la GSK3 β et sa phosphorylation par ERK (Dang 2012; Groulx et al., 2014), nous n'avons pas observé de corrélation entre son expression ni celle de la sous-unité $\alpha 1$ et la présence des mutations des gènes *APC*, *CTNNB1*, *BRAF* ou *KRAS*. D'autre part, un marquage cytoplasmique de MYC était présent seulement dans les tumeurs où l'expression nucléaire était forte, ce qui pourrait refléter soit une production accrue soit une baisse de la dégradation de ce récepteur au niveau du cytoplasme des cellules tumorales. L'expression de MYC a été considérée comme négative ou non spécifique quand une expression cytoplasmique était constatée sans la présence d'un marquage nucléaire. Il est à noter qu'il existe une forme appelée Myc-nick qui résulte du clivage de MYC par la calpaïne et qui est uniquement cytoplasmique, car cette forme n'a pas de signal de localisation nucléaire (Conacci-Sorrell et al., 2010; Mousavi et Sartorelli 2010). Cette forme n'a pas de domaine bHLHZ essentiel à l'hétérodimérisation avec MAX et n'est donc pas impliquée dans l'activité transcriptionnelle de MYC. Comme nous avons constaté que MYC est faiblement exprimé dans le mésenchyme, nous avons donc considéré seulement son expression protéique au niveau épithéliale dans l'étude de la corrélation avec $\alpha 1$ seulement, car cette dernière est exprimée dans les myofibroblastes et les cellules musculaires lisses du stroma des tumeurs, comme observé dans cette étude. Cela suggère que, dans les cellules non épithéliales, l'expression du gène *ITGA1* pourrait être contrôlée par d'autres facteurs de transcription comme les facteurs GATA6, Nkx3.2 et le facteur SFR (Gardner 2014). Le lien entre l'expression du gène *ITGA1* dans le microenvironnement des tumeurs et ces facteurs de transcription reste à déterminer.

5.5. Implication de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans la prolifération, la survie et la migration des cellules cancéreuses colorectales.

Il est bien établi que les intégrines, bien que sans activité enzymatique intrinsèque, sont capables de transmettre des signaux de la cellule vers la matrice, et de la matrice vers la cellule. Dépendamment de l'intégrine impliquée, elles peuvent moduler plusieurs voies de signalisation et réguler des fonctions cellulaires dont la différenciation, la transcription des gènes, la survie et la prolifération (Barczyk et al., 2010; Beausejour et al., 2012). Nous avons montré, pour la première fois que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est impliquée, *in vitro*, dans la prolifération de trois lignées cellulaires colorectales humaines, et dans la croissance tumorale de xénogreffes issues de deux d'entre elles. En fait, cette intégrine est connue pour son importance dans la prolifération des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules du cancer du poumon dans le modèle murin (Pozzi et al., 1998; Abair et al., 2008; Macias-Perez et al., 2008). En effet, $\alpha 1\beta 1$ recrute par l'intermédiaire de la sous-unité $\alpha 1$, la cavéoline-1 qui recrute à son tour des molécules adaptatrices comme Fyn/Yes et Grb2 (Pozzi et al., 1998; Wary et al., 1998), ce qui conduit ensuite à l'activation de la voie RAS/MEK/ERK (Giancotti 2000). Grb2 est exprimé dans le cancer colorectal (Uhlen et al., 2015), et il est important dans sa carcinogénèse (Pomerleau et al., 2014), alors que la cavéoline-1 est régulée positivement par la voie RAS/MEK/ERK dans ce cancer (Basu Roy et al., 2013). Il est donc possible que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ régule la prolifération cellulaire par la voie Cav-1/Grb2/RAS/MEK-ERK. Des expériences de co-immunoprécipitation des protéines pourraient confirmer le lien entre la sous-unité $\alpha 1$, la Cav-1 et Grb2 dans le cancer colorectal, mais aussi par la répression de l'expression de la cavéoline-1 ou celle de Grb2 pour montrer leur implication dans la signalisation induite par l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ et son rôle dans la prolifération cellulaire.

Il est à noter que dans notre étude les tests de prolifération ont été faits en présence de sérum, malgré le fait qu'une compensation par les RTK soit possible et contrebalance la réduction de l'expression de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$. La baisse de la prolifération que nous avons obtenue pourrait donc être encore plus importante en l'absence de sérum. Dans une étude récente, les tests de prolifération ont été effectués sans sérum et sur un mélange

de matrice comportant du collagène I et IV (Macias-Perez et al., 2008), car il est bien connu que les RTK comme l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) et l'HGFR (*Hepatocyte growth factor receptor*) peuvent compenser l'absence de l'activation des intégrines (Soung et al., 2010) et activer la voie RAS/MEK/ERK. Cette dernière peut être régulée par d'autres intégrines comme $\alpha 2 \beta 1$ (Bartolome et al., 2014) notamment dans la lignée HT29. Dans notre étude, l'expression d' $\alpha 2$ n'a pas augmentée suite à la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$. Parmi les trois lignées que nous avons utilisées, HT29 comporte une mutation de *BRAF*, SW480 la mutation de *KRAS*, alors que la lignée T84 ne comporte pas de mutation dans la voie RAS/MEK/ERK (Salari et al., 2012). Nos résultats suggèrent donc que l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ est importante dans la prolifération de ces trois lignées malgré la présence de mutations oncogéniques dans la voie RAS/MEK/ERK dans deux d'entre elles. En relation avec nos résultats dans les cellules tumorales ayant une voie RAS/MEK/ERK supposée active, il est à noter que la mutation de *KRAS*, présente dans 50% des cancers colorectaux (Roberts et Der 2007; Montagut et Settleman 2009) est souvent mono-allélique (di Magliano et Logsdon 2013), suggérant la présence dans la cellule de protéines *KRAS*, mutées et non mutées. Sur le plan individuel *KRAS* fonctionne comme un système *on/off*; son état actif correspond à sa liaison avec le GTP (guanosine triphosphate) sous l'action d'une GEF (*Guanine nucleotide exchange factors*) alors que l'hydrolyse du GTP en GDP (guanosine diphosphate) par une GAP (*GTPaseactivating proteins*) le rend inactif (Jun et al., 2013). La mutation *KRAS* G12D, la plus fréquente, empêche l'action de l'enzyme GAP, ce qui le rend constamment actif. Mais, sur le plan collectif, c'est le rapport entre le nombre des *KRAS* mutés et non mutés dans la cellule qui détermine le caractère constitutivement actif de la voie RAS/MEK/ERK, tel un rhéostat. Il est important de noter que *KRAS* ne peut pas être fonctionnel s'il n'est pas recruté par son groupe farnesyl à la membrane cytoplasmique, même s'il est constitutivement actif. D'autre part, l'activité de ERK, sa localisation et sa translocation au noyau peut dépendre de l'organisation du cytosquelette d'actine sous l'action des intégrines en amont (Aplin et Juliano 1999; Aplin et al., 2001), une telle action de l'intégrine $\alpha 1 \beta 1$ reste à démontrer.

Dans le modèle murin, une équipe de recherche a généré des souris KRAS-LA2/ $\alpha 1$ KO, dans lesquelles KRAS est constitutivement actif (modèle de souris kras-LA2) et l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est absente. Ces souris ont une survie prolongée par rapport aux souris KRAS-LA2/ $\alpha 1$ WT et développent des tumeurs de plus petite taille. Ces tumeurs comportent une baisse de la prolifération des cellules carcinomateuses avec réduction de la phosphorylation de ERK1/2 associée à une augmentation de l'apoptose *in vivo* et *in vitro* (Macias-Perez et al., 2008). Ces derniers paramètres concordent avec nos résultats dans les tumeurs issues des cellules HT29 et T84. De plus, la présence de plages de nécroses plus étendues dans les tumeurs sh- $\alpha 1$, et qui sont souvent au centre des tumeurs, suggère que cette nécrose est secondaire à la réduction de la vascularisation de ces tumeurs. En effet, une étude récente a montré que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est importante pour la prolifération des cellules endothéliales et la tubulogenèse. Dans cette étude, des expériences de mutation sélectives de certains résidus de la queue cytoplasmique de la sous-unité $\alpha 1$ a permis de montrer que ces fonctions sont dépendantes de la sous-unité $\alpha 1$ (Abair et al., 2008). D'autres études ont montré que l'ablation génétique de la sous-unité $\alpha 1$ comme le blocage fonctionnel par des anticorps neutralisants dans les souris entraîne une baisse de la vascularisation intra-tumorale (Senger et al., 1997; Pozzi et al., 2000; Chen et al., 2005). D'autre part, il est à noter que les cellules endothéliales des capillaires intra-tumoraux peuvent avoir trois origines. Elles proviennent soit de la néo-angiogenèse, qui se fait à partir des vaisseaux préexistants, soit de la vasculogenèse qui se fait à partir des cellules hématopoïétiques présentes dans le microenvironnement de la tumeur (Larrivee et Karsan 2007; Dome et al., 2008), soit de la transformation des cellules tumorales elles-mêmes en cellules endothéliales (Ricci-Vitiani et al., 2010; Sajithlal et al., 2010). Ces cellules ont la particularité de comporter des marqueurs de cellules tumorales ainsi que les corps de Weibel Palade (McGuire et al., 2012), qui sont des granules de stockage spécifiques aux cellules endothéliales. Dans notre étude, il n'est pas écarté que la présence de moins de vaisseaux dans les tumeurs HT29 sh- $\alpha 1$ puisse correspondre à une baisse de la population des cellules endothéliales provenant des cellules tumorales. Les anticorps anti- $\alpha 1$ que nous avons utilisés reconnaissent la sous-

unité $\alpha 1$ humaine et les anticorps anti-CD31 reconnaissent les deux espèces humaine et souris. L'utilisation d'anticorps reconnaissant uniquement l'espèce humaine aurait pu nous donner plus de renseignement sur l'origine des cellules endothéliales dans ces tumeurs.

En ce qui a trait à la contribution de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ à la survie cellulaire, nos résultats montrent que la répression de l'expression de cette intégrine n'a pas d'impact significatif sur la suppression de l'anoïkose quand les cellules des trois lignées sont adhérentes alors que ces mêmes cellules (de façon significative pour deux d'entre-elles) deviennent plus sensibles à l'anoïkose quand elles sont en suspension. Il est à noter que les cellules cancéreuses ont une résistance à l'anoïkose beaucoup plus importante que les cellules épithéliales intestinales, qu'elles soient différenciées ou indifférenciées (Demers et al., 2009). En fait, dans l'épithélium intestinal, l'implication des intégrines (principalement les $\beta 1$) dans la survie cellulaire va dépendre de l'état de différenciation des cellules, de l'intégrine impliquée, du recrutement de FAK et/ou Src et nécessairement de l'activation des principales voies de survie PI3-K/Akt et/ou MEK/ERK, en plus du rôle que peut jouer les récepteurs de facteurs de croissance comme l'EGFR (Bouchard et al., 2007; Demers et al., 2009; Beausejour et al., 2012; Beausejour et al., 2013). En effet, l'utilisation d'anticorps neutralisant les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ rend les cellules intestinales indifférenciées sensibles à l'anoïkose, alors que la neutralisation de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ augmente l'anoïkose des cellules différenciées (Beauséjour et al., 2013). Cette dernière intégrine n'est pas exprimée dans le cancer colorectal (Pignatelli et al., 1990; Stallmach et al., 1992). D'autre part l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est nécessaire à la suppression de l'anoïkose des cellules intestinales quel que soit l'état de différenciation, alors que l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ n'a aucun effet sur les cellules indifférenciées quand elles sont adhérentes et son expression dans les cellules cancéreuses colorectales les rend sensibles à l'anoïkose (Benoit et al., 2010). En effet, cette intégrine n'est pas exprimée par les cellules cancéreuses colorectales, contrairement aux intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$. Il n'est donc pas écarté que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, récepteur au collagène comme $\alpha 1\beta 1$, peut représenter un moyen de compensation de la suppression de l'anoïkose en l'absence de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$, quand les

cellules sont adhérentes et non en suspension (dans ce cas l'induction de l'anoïkose est beaucoup plus intense). Le fait que dans les trois lignées que nous avons utilisées, l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ n'est pas augmentée n'écarte pas la possibilité d'un recrutement de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ pour compenser partiellement la signalisation induite par $\alpha 1\beta 1$, car $\alpha 2\beta 1$ peut réguler la voie MAPK/ERK mais aussi la phosphorylation de p38 par des voies de signalisation distinctes (Klekotka et al., 2001; Klekotka et al., 2001). Il est à noter que l'inhibition de la voie MEK/ERK induit l'apoptose pour les deux lignées T84 et HT29 (Demers et al., 2009). Une autre compensation peut être en rapport avec la sécrétion de facteurs de croissances par les cellules tumorales et qui activent de manière autocrine les récepteurs à l'EGF qui pourraient activer Src indépendamment de FAK, ce qui entraîne l'activation des voies de survie PI3K/Akt-1 et MEK/ERK. En fait, FAK n'est même pas nécessaire à la survie des cellules de la lignée T84 quand elles sont adhérentes, contrairement à la lignée HT29 (Demers et al., 2009). Il se peut que la compensation par les facteurs de croissances ne soit pas suffisamment intense, ou que la signalisation induite par l'EGFR ne peut se faire en l'absence de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$, quand les cellules sont en suspension. Il serait donc intéressant de vérifier l'état de phosphorylation de FAK, Src, ERK et celle d'Akt lors de la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$, dans les trois lignées (adhérentes et en suspension) utilisées dans cette étude. Cependant ces résultats restent à compléter avec d'autres approches, comme le test ISEL (*in situ Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*) qui permet de compter le nombre des cellules apoptotiques, car le dosage de l'activité de la caspase 3 ne permettrait pas, à lui seul, de déduire avec exactitude le pourcentage des cellules en apoptose par rapport au reste des cellules en suspension.

Les intégrines sont des acteurs majeurs dans la migration, l'invasion des cellules tumorales (Desgrosellier et Cheresh 2010) (Vicente-Manzanares et al., 2009) ainsi que leur résistance à l'anoïkose qui constitue une condition déterminante pour la métastase (Vachon 2011; Kim et al., 2012). L'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est impliquée dans la migration des leucocytes mais également des cellules tumorales du poumon et du cancer mammaire (Senger et al., 2002; Becker et al., 2013), ce qui rejoint nos observations dans le cancer

colorectal. Cette intégrine est importante pour la migration des cellules HT29 et T84, alors que les cellules SW480 n'ont pas été testées pour cette fonction car elles sont sensibles au traitement par l'hydroxyurée, comme rapporté précédemment (Bian et al., 2015). Il est à noter que dans le modèle murin, l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est aussi impliquée dans l'invasion tumorale dans le carcinome hépatocellulaire, le carcinome pulmonaire et mammaire, notamment par la régulation de l'expression de la stromelysine-1 (Lochter et al., 1999; Yang et al., 2003). Dans le cancer colorectal, une étude a montré que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ participe à l'invasion des cellules cancéreuses colorectales par le recrutement du complexe FAK/Src et l'activation de la voie p130/Cas/JNK et subséquemment par l'augmentation de l'expression des métalloprotéinases matricielles 2 et 9 (Van Slambrouck et al., 2007).

Ces constatations combinées aux résultats de notre étude confirment le rôle positif de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans la progression du cancer colorectal notamment par la régulation de la prolifération, la survie, la migration et l'invasion cellulaires. S'inscrit également dans ce contexte, le fait que l'expression de cette intégrine soit augmentée par l'oncogène MYC. Il est à noter qu'un mécanisme de boucle de régulation positive entre MYC et l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est possible et pourrait impliquer d'autres intégrines régulées par MYC notamment $\alpha 6\beta 4$ (Boudjadi et Beaulieu 2016). En effet, si la voie RAS/MEK/ERK est activée par $\alpha 1\beta 1$, cela pourrait contribuer à la stabilisation de MYC par sa phosphorylation par ERK, et MYC à son tour augmenterait l'expression de la sous-unité $\alpha 1$. Cette association entre MYC et ses cibles peut constituer un des moyens thérapeutiques combinés intéressant pour le traitement du cancer colorectal, comme décrit dans une étude récente (Castell et Larsson 2015). En fait, il existe un traitement actuellement à l'essai clinique en phase I qui utilise des anticorps humanisés neutralisants dirigés contre la sous-unité $\alpha 1$ pour le traitement de certaines maladies immunitaires comme le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde (Inderjeeth 2013). Ce traitement semble prometteur car la réponse est bonne et il est bien toléré selon cette étude. Il serait intéressant de tester ces anticorps pour le traitement du cancer colorectal, soit seuls ou combinés à d'autres cibles comme le facteur oncogénique MYC.

6. Conclusion

L'ensemble de mon travail de thèse a permis de montrer que l'intégrine $\alpha1\beta1$ est surexprimée dans le cancer colorectal par le facteur oncogénique MYC et qu'elle joue un rôle positif dans la progression de ce cancer.

En effet, dans la première partie de ma thèse, j'ai démontré que la sous-unité $\alpha1$ est présente dans 65% des adénocarcinomes colorectaux et que son expression est observée non seulement dans les cellules épithéliales mais aussi dans les cellules du microenvironnement de la tumeur. L'observation de cette sous-unité dès les premiers stades du cancer colorectal et son maintien aux stades avancés reflètent son importance dans l'initiation et la progression de ce cancer.

Dans la deuxième partie de mon travail, en utilisant différentes approches de biologie moléculaire et cellulaire, j'ai également démontré que l'expression de la sous-unité $\alpha1$ est contrôlée directement par le facteur oncogénique MYC par son lien direct sur deux éléments de réponse sur le promoteur du gène *ITGA1*. Ce contrôle s'est reflété par une corrélation significative entre l'expression des deux protéines MYC et $\alpha1$ dans 72% des adénocarcinomes. Ces résultats ont donc contribué à l'identification de la sous-unité $\alpha1$ comme une nouvelle cible directe de l'oncogène MYC dans le cancer colorectal.

Dans la troisième partie de mes travaux, je me suis intéressé aux rôles que peut jouer l'intégrine $\alpha1\beta1$ dans la progression du cancer colorectal. Par des expériences de biologie cellulaire *in vitro*, j'ai pu démontrer pour la première fois que cette intégrine est importante pour la prolifération des cellules tumorales colorectales ainsi que pour leur migration et leur survie. En utilisant des modèles de xénogreffes, j'ai observé que l'intégrine $\alpha1\beta1$ est importante pour la formation et la croissance des tumeurs, *in vivo*. En effet, les tumeurs développées à partir des cellules cancéreuses où l'expression de la sous-unité $\alpha1$ a été réprimée sont de plus petite taille, comportant des plages étendues de nécrose et une faible vascularisation. Ces constatations ont confirmé les résultats obtenus *in vitro*, et sont de concert avec le fait que la sous-unité $\alpha1$ est régulée positivement par le facteur oncogénique MYC.

Collectivement, mes résultats de recherche apportent de nouvelles connaissances dans la compréhension de l'implication des intégrines dans la carcinogenèse colorectale et la régulation de leur expression. L'intégrine $\alpha 1\beta 1$ peut représenter une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer colorectal, soit seule ou combinée à un traitement ciblant l'oncogène MYC.

7. Perspectives

Dans ce travail, j'ai trouvé que la sous-unité $\alpha 1$ est exprimée dans 65% des cancers colorectaux, et que sa présence est observée dans tous les stades incluant le stade 1. Il serait donc intéressant de vérifier son expression, en messager et en protéine, dans les lésions dysplasiques. D'autre part, son expression pourrait aussi être vérifiée dans des échantillons de fèces provenant de patients dont le diagnostic est confirmé pour adénomes et pour les différents stades de cancers colorectaux, en comparaison avec les selles de patients sains. Si comme pour l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ (Beaulieu et al., 2016) l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ se confirme dans les fèces, elle pourrait représenter un candidat prometteur comme marqueur de dépistage du cancer colorectal. Comme j'ai observé que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est importante pour la prolifération des cellules cancéreuses colorectales et que cette intégrine se singularise par le recrutement de la cavéoline-1 et active la voie RAS/MEK/ERK, il serait intéressant de vérifier par co-immunoprécipitation des protéines si $\alpha 1$ recrute la cavéoline-1 dans le contexte du cancer colorectal. Un autre moyen consisterait à réprimer l'expression de la cavéoline-1 et forcer l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ et regarder si les fonctions de la sous-unité $\alpha 1$ sont perdues ou non.

Un fait très intéressant dans mon étude est que la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ a entraîné non seulement une altération de la tumorigénicité mais aussi une augmentation de la nécrose tumorale. Ce dernier événement pourrait être exploité pour cibler à la fois la prolifération et la nécrose tumorales. Comme $\alpha 1$ est également présente dans les vaisseaux et importante dans la prolifération des cellules endothéliales, il serait très pertinent de vérifier si le blocage de la fonction de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ entraîne une régression tumorale significative. L'expérience pourrait être réalisée en utilisant un modèle murin de développement spontané de tumeurs colorectales, comme le modèle APC^{min}/AOM (Issa et al., 2007; Bhalla et al., 2011; Bernatchez et al., 2013). Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps neutralisants la fonction de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ confirmerait aussi les effets que j'ai observés par abolition de l'expression (par sh-ARN), en vue de valider cette intégrine comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement du cancer colorectal.

8. Remerciements

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse Pr Jean-François Beaulieu et Pre Julie Carrier pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de travailler sur des projets très intéressants. Je remercie le professeur Beaulieu pour son aide et sa disponibilité et pour ses précieux conseils qui ont été pertinents pour mener à terme mon projet de recherche. Je remercie également tous les membres du laboratoire pour leur disponibilité, leurs commentaires et suggestions, mais aussi pour leur amitié.

Je remercie vivement les Pr Pierre Henri Vachon, Pr Benoit Paquette, Pre Julie Carrier, Pr Jean-François Beaulieu et le Pr Serge Jothy pour avoir accepté de faire partie de mon Jury de thèse.

J'exprime la plus grande reconnaissance vers Dieu qui m'a doté de toute l'intelligence et la capacité à penser, à innover et à croire en moi-même. Mes remerciements pour mes parents sont incommensurables, car mon père Aziz, que Dieu agrée son âme, et ma mère Fatma ont beaucoup donné et sacrifié tout au long de mes études. Je les remercie également pour leur présence, malgré l'éloignement, et leur soutien inconditionnel. Je remercie également ma femme Chahrazed pour son amour, ses encouragements et tout son apport pour mon succès.

Je tiens à remercier également mon fils Mohamed Abd El-Aziz pour le bonheur et la joie qu'il m'a apporté durant les années de mon doctorat, qui les a rendus unes des plus agréables années.

9. Liste des références :

- Aaltonen, L. A., S. R. Hamilton, World Health Organization. and International Agency for Research on Cancer. (2000). Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon Oxford, IARC Press ;
- Oxford University Press (distributor.
- Abair, T. D., N. Bulus, C. Borza, M. Sundaramoorthy, R. Zent and A. Pozzi (2008). "Functional analysis of the cytoplasmic domain of the integrin {alpha}1 subunit in endothelial cells." *Blood* **112**(8): 3242-3254.
- Agarwal, R., S. Lade, D. Liew, T. M. Rogers, D. Byrne, F. Feleppa, S. Juneja and D. A. Westerman (2016). "Role of immunohistochemistry in the era of genetic testing in MYC-positive aggressive B-cell lymphomas: a study of 209 cases." *J Clin Pathol* **69**(3): 266-270.
- Aplin, A. E. and R. L. Juliano (1999). "Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway." *J Cell Sci* **112** (Pt 5): 695-706.
- Aplin, A. E., S. A. Stewart, R. K. Assoian and R. L. Juliano (2001). "Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1." *J Cell Biol* **153**(2): 273-282.
- Armaghany, T., J. D. Wilson, Q. Chu and G. Mills (2012). "Genetic alterations in colorectal cancer." *Gastrointest Cancer Res* **5**(1): 19-27.
- Arnaout, M. A., B. Mahalingam and J. P. Xiong (2005). "Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 381-410.
- Aune, D., D. S. Chan, R. Lau, R. Vieira, D. C. Greenwood, E. Kampman and T. Norat (2011). "Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies." *BMJ* **343**: d6617.
- Ayer, D. E., L. Kretzner and R. N. Eisenman (1993). "Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity." *Cell* **72**(2): 211-222.
- Barczyk, M., S. Carracedo and D. Gullberg (2010). "Integrins." *Cell Tissue Res* **339**(1): 269-280.
- Bartolome, R. A., R. Barderas, S. Torres, M. J. Fernandez-Acenero, M. Mendes, J. Garcia-Foncillas, M. Lopez-Lucendo and J. I. Casal (2014). "Cadherin-17 interacts with alpha2beta1 integrin to regulate cell proliferation and adhesion in colorectal cancer cells causing liver metastasis." *Oncogene* **33**(13): 1658-1669.
- Basora, N., N. Desloges, Q. Chang, Y. Bouatrouss, J. Gosselin, J. Poisson, D. Sheppard and J. F. Beaulieu (1998). "Expression of the alpha9beta1 integrin in human colonic epithelial cells: resurgence of the fetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines." *Int J Cancer* **75**(5): 738-743.
- Basora, N., F. E. Herring-Gillam, F. Boudreau, N. Perreault, L. P. Pageot, M. Simoneau, Y. Bouatrouss and J. F. Beaulieu (1999). "Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells." *J Biol Chem* **274**(42): 29819-29825.
- Basu Roy, U. K., R. S. Henkhaus, F. Loupakis, C. Cremolini, E. W. Gerner and N. A. Ignatenko (2013). "Caveolin-1 is a novel regulator of K-RAS-dependent migration in colon carcinogenesis." *Int J Cancer* **133**(1): 43-57.
- Bates, R. C. (2005). "Colorectal cancer progression: integrin alphavbeta6 and the epithelial-mesenchymal transition (EMT)." *Cell Cycle* **4**(10): 1350-1352.
- Beaulieu, J. F. (1992). "Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine." *J Cell Sci* **102** (Pt 3): 427-436.

- Beaulieu, J. F. (1997). "Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation." *Prog Histochem Cytochem* **31**(4): 1-78.
- Beaulieu, J. F. (1999). "Integrins and human intestinal cell functions." *Front Biosci* **4**: D310-321.
- Beaulieu, J. F., E. Herring, S. Kanaoka and E. Tremblay (2016). "Use of integrin alpha 6 transcripts in a stool mRNA assay for the detection of colorectal cancers at curable stages." *Oncotarget*.
- Beaulieu, J. F., B. Nichols and A. Quaroni (1989). "Posttranslational regulation of sucrase-isomaltase expression in intestinal crypt and villus cells." *J Biol Chem* **264**(33): 20000-20011.
- Beaulieu, J. F. and A. Quaroni (1991). "Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells." *Biochem J* **280** (Pt 3): 599-608.
- Beaulieu, J. F., P. H. Vachon, F. E. Herring-Gillam, A. Simoneau, N. Perreault, C. Asselin and J. Durand (1994). "Expression of the alpha-5(IV) collagen chain in the fetal human small intestine." *Gastroenterology* **107**(4): 957-967.
- Beausejour, M., D. Noel, S. Thibodeau, V. Bouchard, C. Harnois, J. F. Beaulieu, M. J. Demers and P. H. Vachon (2012). "Integrin/Fak/Src-mediated regulation of cell survival and anoikis in human intestinal epithelial crypt cells: selective engagement and roles of PI3-K isoform complexes." *Apoptosis* **17**(6): 566-578.
- Beausejour, M., S. Thibodeau, M. J. Demers, V. Bouchard, R. Gauthier, J. F. Beaulieu and P. H. Vachon (2013). "Suppression of anoikis in human intestinal epithelial cells: differentiation state-selective roles of alpha2beta1, alpha3beta1, alpha5beta1, and alpha6beta4 integrins." *BMC Cell Biol* **14**: 53.
- Becker, H. M., J. Rullo, M. Chen, M. Ghazarian, S. Bak, H. Xiao, J. B. Hay and M. I. Cybulsky (2013). "alpha1beta1 integrin-mediated adhesion inhibits macrophage exit from a peripheral inflammatory lesion." *J Immunol* **190**(8): 4305-4314.
- Belaguli, N. S., M. Aftab, M. Rigi, M. Zhang, D. Albo and D. H. Berger (2010). "GATA6 promotes colon cancer cell invasion by regulating urokinase plasminogen activator gene expression." *Neoplasia* **12**(11): 856-865.
- Benoit, Y. D., J. F. Larrivee, J. F. Groulx, J. Stankova, P. H. Vachon and J. F. Beaulieu (2010). "Integrin alpha8beta1 confers anoikis susceptibility to human intestinal epithelial crypt cells." *Biochem Biophys Res Commun* **399**(3): 434-439.
- Benoit, Y. D., M. B. Lepage, T. Khalfaoui, E. Tremblay, N. Basora, J. C. Carrier, L. J. Gudas and J. F. Beaulieu (2012). "Polycomb repressive complex 2 impedes intestinal cell terminal differentiation." *J Cell Sci* **125**(Pt 14): 3454-3463.
- Benoit, Y. D., C. Lussier, P. A. Ducharme, S. Sivret, L. M. Schnapp, N. Basora and J. F. Beaulieu (2009). "Integrin alpha8beta1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism." *Biol Cell* **101**(12): 695-708.
- Benoit, Y. D., F. Pare, C. Francoeur, D. Jean, E. Tremblay, F. Boudreau, F. Escaffit and J. F. Beaulieu (2010). "Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**(4): G504-517.
- Bernatchez, G., V. Giroux, T. Lassalle, A. C. Carpentier, N. Rivard and J. C. Carrier (2013). "ERRalpha metabolic nuclear receptor controls growth of colon cancer cells." *Carcinogenesis* **34**(10): 2253-2261.
- Bernstein, A. M., M. Song, X. Zhang, A. Pan, M. Wang, C. S. Fuchs, N. Le, A. T. Chan, W. C. Willett, S. Ogino, E. L. Giovannucci and K. Wu (2015). "Processed and Unprocessed Red Meat and

- Risk of Colorectal Cancer: Analysis by Tumor Location and Modification by Time." *PLoS one* **10**(8): e0135959.
- Bettess, M. D., N. Dubois, M. J. Murphy, C. Dubey, C. Roger, S. Robine and A. Trumpp (2005). "c-Myc is required for the formation of intestinal crypts but dispensable for homeostasis of the adult intestinal epithelium." *Mol Cell Biol* **25**(17): 7868-7878.
- Bhalla, K., B. J. Hwang, R. E. Dewi, L. Ou, W. Twaddel, H. B. Fang, S. B. Vafai, F. Vazquez, P. Puigserver, L. Boros and G. D. Girnun (2011). "PGC1alpha promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis." *Cancer Res* **71**(21): 6888-6898.
- Bian, B., S. Mongrain, S. Cagnol, M. J. Langlois, J. Boulanger, G. Bernatchez, J. C. Carrier, F. Boudreau and N. Rivard (2015). "Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis." *Mol Carcinog*.
- Blackwood, E. M. and R. N. Eisenman (1991). "Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc." *Science* **251**(4998): 1211-1217.
- Boland, C. R. and A. Goel (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." *Gastroenterology* **138**(6): 2073-2087 e2073.
- Borger, M. E., M. J. Gosens, J. W. Jeuken, L. C. van Kempen, C. J. van de Velde, J. H. van Krieken and I. D. Nagtegaal (2007). "Signet ring cell differentiation in mucinous colorectal carcinoma." *J Pathol* **212**(3): 278-286.
- Bouchard, V., M. J. Demers, S. Thibodeau, V. Laquerre, N. Fujita, T. Tsuruo, J. F. Beaulieu, R. Gauthier, A. Vezina, L. Villeneuve and P. H. Vachon (2007). "Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways." *Journal of cellular physiology* **212**(3): 717-728.
- Boudjadi, S. and J. F. Beaulieu (2016). "MYC and integrins interplay in colorectal cancer." *Oncoscience* **Vol. 3**, (No.2): p50-51.
- Boudjadi, S., G. Bernatchez, J. F. Beaulieu and J. C. Carrier (2013). "Control of the human osteopontin promoter by ERalpha in colorectal cancer." *Am J Pathol* **183**(1): 266-276.
- Boudjadi, S., J. C. Carrier and J. F. Beaulieu (2013). "Integrin alpha1 subunit is up-regulated in colorectal cancer." *Biomark Res* **1**(1): 16.
- Boudjadi, S., J. C. Carrier, J. F. Groulx and J. F. Beaulieu (2015). "Integrin alpha1beta1 expression is controlled by c-MYC in colorectal cancer cells." *Oncogene*.
- Brenner, C., R. Deplus, C. Didelot, A. Lorient, E. Vire, C. De Smet, A. Gutierrez, D. Danovi, D. Bernard, T. Boon, P. G. Pelicci, B. Amati, T. Kouzarides, Y. de Launoit, L. Di Croce and F. Fuks (2005). "Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor." *EMBO J* **24**(2): 336-346.
- Brosh, R. and V. Rotter (2009). "When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field." *Nat Rev Cancer* **9**(10): 701-713.
- Byzova, T. V., C. K. Goldman, N. Pampori, K. A. Thomas, A. Bett, S. J. Shattil and E. F. Plow (2000). "A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins." *Mol Cell* **6**(4): 851-860.
- Calon, A., E. Espinet, S. Palomo-Ponce, D. V. Tauriello, M. Iglesias, M. V. Cespedes, M. Sevillano, C. Nadal, P. Jung, X. H. Zhang, D. Byrom, A. Riera, D. Rossell, R. Mangués, J. Massague, E. Sancho and E. Batlle (2012). "Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation." *Cancer Cell* **22**(5): 571-584.
- Carninci, P., A. Sandelin, B. Lenhard, S. Katayama, K. Shimokawa, J. Ponjavic, C. A. Semple, M. S. Taylor, P. G. Engstrom, M. C. Frith, A. R. Forrest, W. B. Alkema, S. L. Tan, C. Plessy, R. Kodzius, T. Ravasi, T. Kasukawa, S. Fukuda, M. Kanamori-Katayama, Y. Kitazume, H. Kawaji, C. Kai, M. Nakamura, H. Konno, K. Nakano, S. Mottagui-Tabar, P. Arner, A. Chesi,

- S. Gustincich, F. Persichetti, H. Suzuki, S. M. Grimmond, C. A. Wells, V. Orlando, C. Wahlestedt, E. T. Liu, M. Harbers, J. Kawai, V. B. Bajic, D. A. Hume and Y. Hayashizaki (2006). "Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution." *Nat Genet* **38**(6): 626-635.
- Carr, P. R., V. Walter, H. Brenner and M. Hoffmeister (2016). "Meat subtypes and their association with colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis." *International journal of cancer* **138**(2): 293-302.
- Castell, A. and L. G. Larsson (2015). "Targeting MYC Translation in Colorectal Cancer." *Cancer Discov* **5**(7): 701-703.
- Chang, C. C., Y. C. Liu, R. P. Cleveland and S. L. Perkins (2000). "Expression of c-Myc and p53 correlates with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphomas." *Am J Clin Pathol* **113**(4): 512-518.
- Chantret, I., A. Barbat, E. Dussaulx, M. G. Brattain and A. Zweibaum (1988). "Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines." *Cancer Res* **48**(7): 1936-1942.
- Cheli, Y., S. Kanaji, B. Jacquelin, M. Chang, D. J. Nugent and T. J. Kunicki (2007). "Transcriptional and epigenetic regulation of the integrin collagen receptor locus ITGA1-PELO-ITGA2." *Biochim Biophys Acta* **1769**(9-10): 546-558.
- Chen, N. and Q. Zhou (2005). "Constructing tissue microarrays without prefabricating recipient blocks: a novel approach." *Am J Clin Pathol* **124**(1): 103-107.
- Chen, X., Y. Su, B. Fingleton, H. Acuff, L. M. Matrisian, R. Zent and A. Pozzi (2005). "Increased plasma MMP9 in integrin alpha1-null mice enhances lung metastasis of colon carcinoma cells." *Int J Cancer* **116**(1): 52-61.
- Chen, X., Y. Su, B. Fingleton, H. Acuff, L. M. Matrisian, R. Zent and A. Pozzi (2005). "An orthotopic model of lung cancer to analyze primary and metastatic NSCLC growth in integrin alpha1-null mice." *Clin Exp Metastasis* **22**(2): 185-193.
- Chen, Y., J. Xu, S. Borowicz, C. Collins, D. Huo and O. I. Olopade (2011). "c-Myc activates BRCA1 gene expression through distal promoter elements in breast cancer cells." *BMC Cancer* **11**: 246.
- Choy, M. Y., P. I. Richman, M. A. Horton and T. T. MacDonald (1990). "Expression of the VLA family of integrins in human intestine." *J Pathol* **160**(1): 35-40.
- Conacci-Sorrell, M., C. Ngouenet and R. N. Eisenman (2010). "Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation." *Cell* **142**(3): 480-493.
- Conlin, A., G. Smith, F. A. Carey, C. R. Wolf and R. J. Steele (2005). "The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma." *Gut* **54**(9): 1283-1286.
- Dang, C. V. (2012). "MYC on the path to cancer." *Cell* **149**(1): 22-35.
- Dang, C. V., K. A. O'Donnell, K. I. Zeller, T. Nguyen, R. C. Osthus and F. Li (2006). "The c-Myc target gene network." *Semin Cancer Biol* **16**(4): 253-264.
- de Jonge, A. V., T. J. Roosma, I. Houtenbos, W. L. Vasmel, K. van de Hem, J. P. de Boer, T. van Maanen, G. Lindauer-van der Werf, A. Beeker, G. J. Timmers, C. G. Schaar, M. Soesan, P. J. Poddighe, D. de Jong and M. E. Chamuleau (2016). "Diffuse large B-cell lymphoma with MYC gene rearrangements: Current perspective on treatment of diffuse large B-cell lymphoma with MYC gene rearrangements; case series and review of the literature." *Eur J Cancer* **55**: 140-146.
- Demers, M. J., S. Thibodeau, D. Noel, N. Fujita, T. Tsuruo, R. Gauthier, M. Arguin and P. H. Vachon (2009). "Intestinal epithelial cancer cell anoikis resistance: EGFR-mediated sustained

- activation of Src overrides Fak-dependent signaling to MEK/Erk and/or PI3-K/Akt-1." *Journal of cellular biochemistry* **107**(4): 639-654.
- Demers, M. J., S. Thibodeau, D. Noel, N. Fujita, T. Tsuruo, R. Gauthier, M. Arguin and P. H. Vachon (2009). "Intestinal epithelial cancer cell anoikis resistance: EGFR-mediated sustained activation of Src overrides Fak-dependent signaling to MEK/Erk and/or PI3-K/Akt-1." *J Cell Biochem* **107**.
- Desgrosellier, J. S. and D. A. Cheresh (2010). "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." *Nat Rev Cancer* **10**(1): 9-22.
- Desloges, N., N. Basora, N. Perreault, Y. Bouatrouss, D. Sheppard and J. F. Beaulieu (1998). "Regulated expression of the integrin alpha9beta1 in the epithelium of the developing human gut and in intestinal cell lines: relation with cell proliferation." *J Cell Biochem* **71**(4): 536-545.
- di Magliano, M. P. and C. D. Logsdon (2013). "Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression." *Gastroenterology* **144**(6): 1220-1229.
- Dieckgraefe, B. K., S. A. Santoro and D. H. Alpers (1996). "Immunolocalization of alpha-integrin subunits and extracellular matrix components during human colonic organogenesis." *Gastroenterology* **110**(1): 58-71.
- Dome, B., J. Dobos, J. Tovari, S. Paku, G. Kovacs, G. Ostoros and J. Timar (2008). "Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: characterization, mobilization, and therapeutic considerations in malignant disease." *Cytometry A* **73**(3): 186-193.
- Du, X., L. Han, A. Y. Guo and Z. Zhao (2012). "Features of methylation and gene expression in the promoter-associated CpG islands using human methylome data." *Comp Funct Genomics* **2012**: 598987.
- Dydensborg, A. B., E. Herring, J. Auclair, E. Tremblay and J. F. Beaulieu (2006). "Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(5): G1067-1074.
- Dydensborg, A. B., I. C. Teller, N. Basora, J. F. Groulx, J. Auclair, C. Francoeur, F. Escaffit, F. Pare, E. Herring, D. Menard and J. F. Beaulieu (2009). "Differential expression of the integrins alpha6Abeta4 and alpha6Bbeta4 along the crypt-villus axis in the human small intestine." *Histochem Cell Biol* **131**(4): 531-536.
- Dydensborg, A. B., I. C. Teller, J. F. Groulx, N. Basora, F. Pare, E. Herring, R. Gauthier, D. Jean and J. F. Beaulieu (2009). "Integrin alpha6Bbeta4 inhibits colon cancer cell proliferation and c-Myc activity." *BMC Cancer* **9**: 223.
- Elliott, K., D. Sakamuro, A. Basu, W. Du, W. Wunner, P. Staller, S. Gaubatz, H. Zhang, E. Prochownik, M. Eilers and G. C. Prendergast (1999). "Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms." *Oncogene* **18**(24): 3564-3573.
- Erisman, M. D., P. G. Rothberg, R. E. Diehl, C. C. Morse, J. M. Spandorfer and S. M. Astrin (1985). "Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene." *Mol Cell Biol* **5**(8): 1969-1976.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman and F. Bray (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int J Cancer* **136**(5): E359-386.
- Fernandez, P. C., S. R. Frank, L. Wang, M. Schroeder, S. Liu, J. Greene, A. Cocito and B. Amati (2003). "Genomic targets of the human c-Myc protein." *Genes Dev* **17**(9): 1115-1129.
- Ferreira, C. G., C. Tolis and G. Giaccone (1999). "p53 and chemosensitivity." *Ann Oncol* **10**(9): 1011-1021.

- Francoeur, C., Y. Bouatrouss, A. Seltana, I. V. Pinchuk, P. H. Vachon, D. W. Powell, B. Sawan, E. G. Seidman and J. F. Beaulieu (2009). "Degeneration of the pericryptal myofibroblast sheath by proinflammatory cytokines in inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* **136**(1): 268-277 e263.
- Gagne, D., J. F. Groulx, Y. D. Benoit, N. Basora, E. Herring, P. H. Vachon and J. F. Beaulieu (2010). "Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism." *J Cell Physiol* **222**(2): 387-400.
- Galas, A., M. Augustyniak and E. Sochacka-Tatara (2013). "Does dietary calcium interact with dietary fiber against colorectal cancer? A case-control study in Central Europe." *Nutrition journal* **12**: 134.
- Gardner, H. (2003). "Integrin $\alpha 1\beta 1$." Landes Bioscience, Georgetown.(Domains in Integrins 14).
- Gardner, H. (2014). "Integrin $\alpha 1\beta 1$." *Adv Exp Med Biol* **819**: 21-39.
- Gardner, H., A. Broberg, A. Pozzi, M. Laato and J. Heino (1999). "Absence of integrin $\alpha 1\beta 1$ in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis." *J Cell Sci* **112 (Pt 3)**: 263-272.
- Gebhardt, A., M. Frye, S. Herold, S. A. Benitah, K. Braun, B. Samans, F. M. Watt, H. P. Elsasser and M. Eilers (2006). "Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1." *J Cell Biol* **172**(1): 139-149.
- Giancotti, F. G. (1997). "Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression." *Curr Opin Cell Biol* **9**(5): 691-700.
- Giancotti, F. G. (2000). "Complexity and specificity of integrin signalling." *Nat Cell Biol* **2**(1): E13-14.
- Gogali, A., K. Charalabopoulos and S. Constantopoulos (2004). "Integrin receptors in primary lung cancer." *Exp Oncol* **26**(2): 106-110.
- Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James and R. N. Eisenman (2000). "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 653-699.
- Groulx, J. F., D. Gagne, Y. D. Benoit, D. Martel, N. Basora and J. F. Beaulieu (2011). "Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell-fibronectin interactions." *Matrix Biol* **30**(3): 195-206.
- Groulx, J. F., V. Giroux, M. Beausejour, S. Boudjadi, N. Basora, J. C. Carrier and J. F. Beaulieu (2014). "Integrin $\alpha 6A$ splice variant regulates proliferation and the Wnt/ β -catenin pathway in human colorectal cancer cells." *Carcinogenesis*.
- Guenther, M. G., S. S. Levine, L. A. Boyer, R. Jaenisch and R. A. Young (2007). "A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells." *Cell* **130**(1): 77-88.
- Hatzis, P., L. G. van der Flier, M. A. van Driel, V. Guryev, F. Nielsen, S. Denissov, I. J. Nijman, J. Koster, E. E. Santo, W. Welboren, R. Versteeg, E. Cuppen, M. van de Wetering, H. Clevers and H. G. Stunnenberg (2008). "Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells." *Mol Cell Biol* **28**(8): 2732-2744.
- Hawinkels, L. J., M. Paauwe, H. W. Verspaget, E. Wiercinska, J. M. van der Zon, K. van der Ploeg, P. J. Koelink, J. H. Lindeman, W. Mesker, P. ten Dijke and C. F. Sier (2014). "Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF- β signaling in cancer-associated fibroblasts." *Oncogene* **33**(1): 97-107.
- Hawinkels, L. J., H. W. Verspaget, J. J. van der Reijden, J. M. van der Zon, J. H. Verheijen, D. W. Hommes, C. B. Lamers and C. F. Sier (2009). "Active TGF- β 1 correlates with myofibroblasts and malignancy in the colorectal adenoma-carcinoma sequence." *Cancer Sci* **100**(4): 663-670.

- He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science* **281**(5382): 1509-1512.
- He, X., X. Tan, X. Wang, H. Jin, L. Liu, L. Ma, H. Yu and Z. Fan (2014). "C-Myc-activated long noncoding RNA CCAT1 promotes colon cancer cell proliferation and invasion." *Tumour Biol.*
- Hemler, M. E., D. Glass, J. S. Coblyn and J. G. Jacobson (1986). "Very late activation antigens on rheumatoid synovial fluid T lymphocytes. Association with stages of T cell activation." *J Clin Invest* **78**(3): 696-702.
- Hongxing, Z., Y. Nancai, S. Wen, H. Guofu, W. Yanxia, H. Hanju, L. Qian, M. Wei, Y. Yandong and H. Hao (2008). "Depletion of c-Myc inhibits human colon cancer colo 320 cells' growth." *Cancer Biother Radiopharm* **23**(2): 229-237.
- Huang, M. J., Y. C. Cheng, C. R. Liu, S. Lin and H. E. Liu (2006). "A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia." *Exp Hematol* **34**(11): 1480-1489.
- Humphries, M. J., E. J. Symonds and A. P. Mould (2003). "Mapping functional residues onto integrin crystal structures." *Curr Opin Struct Biol* **13**(2): 236-243.
- Hurlin, P. J., C. Queva and R. N. Eisenman (1997). "Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites." *Genes Dev* **11**(1): 44-58.
- Ikeda, K., K. Iyama, N. Ishikawa, H. Egami, M. Nakao, Y. Sado, Y. Ninomiya and H. Baba (2006). "Loss of expression of type IV collagen alpha5 and alpha6 chains in colorectal cancer associated with the hypermethylation of their promoter region." *Am J Pathol* **168**(3): 856-865.
- Inderjeeth, C., Redfern, Andrew, Huang, Michael, Hardiman, Yun, Grant, Theresa, Fritz, Lawrence C (2013). "Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics Of SAN-300, a Novel Monoclonal Antibody Against Very Late Antigen-1: Results Of a Phase 1 Study In Healthy Volunteers and Patients With Active Rheumatoid Arthritis." *Arthritis Rheum* **65**:1439.
- Issa, A. Y., S. R. Volate, S. J. Muga, D. Nitcheva, T. Smith and M. J. Wargovich (2007). "Green tea selectively targets initial stages of intestinal carcinogenesis in the AOM-ApcMin mouse model." *Carcinogenesis* **28**(9): 1978-1984.
- Joensuu, E. I., T. T. Nieminen, J. E. Lotsari, W. Pavicic, W. M. Abdel-Rahman and P. Peltomaki (2015). "Methyltransferase expression and tumor suppressor gene methylation in sporadic and familial colorectal cancer." *Genes Chromosomes Cancer* **54**(12): 776-787.
- Jun, J. E., I. Rubio and J. P. Roose (2013). "Regulation of ras exchange factors and cellular localization of ras activation by lipid messengers in T cells." *Front Immunol* **4**: 239.
- Juven-Gershon, T. and J. T. Kadonaga (2010). "Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery." *Dev Biol* **339**(2): 225-229.
- Kern, A. and E. E. Marcantonio (1998). "Role of the I-domain in collagen binding specificity and activation of the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1." *J Cell Physiol* **176**(3): 634-641.
- Khalifaoui, T., J. F. Groulx, G. Sabra, A. GuezGuez, N. Basora, P. Vermette and J. F. Beaulieu (2013). "Laminin receptor 37/67LR regulates adhesion and proliferation of normal human intestinal epithelial cells." *PLoS One* **8**(8): e74337.
- Kim, T. H., L. O. Barrera, M. Zheng, C. Qu, M. A. Singer, T. A. Richmond, Y. Wu, R. D. Green and B. Ren (2005). "A high-resolution map of active promoters in the human genome." *Nature* **436**(7052): 876-880.
- Kim, Y. N., K. H. Koo, J. Y. Sung, U. J. Yun and H. Kim (2012). "Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis." *Int J Cell Biol* **2012**: 306879.

- Klekotka, P. A., S. A. Santoro, H. Wang and M. M. Zutter (2001). "Specific residues within the alpha 2 integrin subunit cytoplasmic domain regulate migration and cell cycle progression via distinct MAPK pathways." *J Biol Chem* **276**(34): 32353-32361.
- Klekotka, P. A., S. A. Santoro and M. M. Zutter (2001). "alpha 2 integrin subunit cytoplasmic domain-dependent cellular migration requires p38 MAPK." *J Biol Chem* **276**(12): 9503-9511.
- Kolligs, F. T., G. Bommer and B. Goke (2002). "Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis." *Digestion* **66**(3): 131-144.
- Konsavage, W. M., Jr., G. Jin and G. S. Yochum (2012). "The Myc 3' Wnt-responsive element regulates homeostasis and regeneration in the mouse intestinal tract." *Mol Cell Biol* **32**(19): 3891-3902.
- Kopfstein, L. and G. Christofori (2006). "Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment." *Cell Mol Life Sci* **63**(4): 449-468.
- Koukoulis, G. K., W. H. Warren, I. Virtanen and V. E. Gould (1997). "Immunolocalization of integrins in the normal lung and in pulmonary carcinomas." *Hum Pathol* **28**(9): 1018-1025.
- Larrivee, B. and A. Karsan (2007). "Involvement of marrow-derived endothelial cells in vascularization." *Handb Exp Pharmacol*(180): 89-114.
- Le Tourneau, C., S. Faivre and E. Raymond (2007). "The role of integrins in colorectal cancer." *Oncology (Williston Park)* **21**(9 Suppl 3): 21-24.
- Li, A. C. and R. P. Thompson (2003). "Basement membrane components." *J Clin Pathol* **56**(12): 885-887.
- Li, Z., S. Van Calcar, C. Qu, W. K. Cavenee, M. Q. Zhang and B. Ren (2003). "A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8164-8169.
- Lieberman, D. A., D. K. Rex, S. J. Winawer, F. M. Giardiello, D. A. Johnson and T. R. Levin (2012). "Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer." *Gastroenterology* **143**(3): 844-857.
- Lin, C. P., J. D. Liu, J. M. Chow, C. R. Liu and H. E. Liu (2007). "Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells." *Anticancer Drugs* **18**(2): 161-170.
- Lin, J., M. Lai, Q. Huang, Y. Ma, J. Cui and W. Ruan (2007). "Methylation patterns of IGFBP7 in colon cancer cell lines are associated with levels of gene expression." *J Pathol* **212**(1): 83-90.
- Liu, X., M. Vorontchikhina, Y. L. Wang, F. Faiola and E. Martinez (2008). "STAGA recruits Mediator to the MYC oncoprotein to stimulate transcription and cell proliferation." *Mol Cell Biol* **28**(1): 108-121.
- Lochter, A., M. Navre, Z. Werb and M. J. Bissell (1999). "alpha1 and alpha2 integrins mediate invasive activity of mouse mammary carcinoma cells through regulation of stromelysin-1 expression." *Mol Biol Cell* **10**(2): 271-282.
- Luo, B. H., C. V. Carman and T. A. Springer (2007). "Structural basis of integrin regulation and signaling." *Annu Rev Immunol* **25**: 619-647.
- Luscher, B. (2012). "MAD1 and its life as a MYC antagonist: an update." *Eur J Cell Biol* **91**(6-7): 506-514.
- Lussier, C., N. Basora, Y. Bouatrouss and J. F. Beaulieu (2000). "Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa." *Microsc Res Tech* **51**(2): 169-178.

- MacDonald, T. T., M. A. Horton, M. Y. Choy and P. I. Richman (1990). "Increased expression of laminin/collagen receptor (VLA-1) on epithelium of inflamed human intestine." *J Clin Pathol* **43**(4): 313-315.
- Macias-Perez, I., C. Borza, X. Chen, X. Yan, R. Ibanez, G. Mernaugh, L. M. Matrisian, R. Zent and A. Pozzi (2008). "Loss of integrin alpha1beta1 ameliorates Kras-induced lung cancer." *Cancer Res* **68**(15): 6127-6135.
- McCabe, M. T., J. C. Brandes and P. M. Vertino (2009). "Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications." *Clin Cancer Res* **15**(12): 3927-3937.
- McGuire, T. F., G. B. Sajithlal, J. Lu, R. D. Nicholls and E. V. Prochownik (2012). "In vivo evolution of tumor-derived endothelial cells." *PLoS One* **7**(5): e37138.
- Mechtersheimer, G., T. Barth, A. Quentmeier and P. Moller (1994). "Differential expression of beta 1 integrins in nonneoplastic smooth and striated muscle cells and in tumors derived from these cells." *Am J Pathol* **144**(6): 1172-1182.
- Mendoza, M. and C. Khanna (2009). "Revisiting the seed and soil in cancer metastasis." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(7): 1452-1462.
- Miller, P. E., P. Lazarus, S. M. Lesko, A. J. Cross, R. Sinha, J. Laio, J. Zhu, G. Harper, J. E. Muscat and T. J. Hartman (2013). "Meat-related compounds and colorectal cancer risk by anatomical subsite." *Nutrition and cancer* **65**(2): 202-226.
- Mills, S. E. (2007). *Histology for pathologists*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Miner, J. H. and P. D. Yurchenco (2004). "Laminin functions in tissue morphogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 255-284.
- Miyamoto, S., H. Teramoto, O. A. Coso, J. S. Gutkind, P. D. Burbelo, S. K. Akiyama and K. M. Yamada (1995). "Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules." *J Cell Biol* **131**(3): 791-805.
- Mo, H. and M. Henriksson (2006). "Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(16): 6344-6349.
- Montagut, C. and J. Settleman (2009). "Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy." *Cancer Lett* **283**(2): 125-134.
- Moskal, A., T. Norat, P. Ferrari and E. Riboli (2007). "Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies." *International journal of cancer* **120**(3): 664-671.
- Mousavi, K. and V. Sartorelli (2010). "Myc-nick: the force behind c-Myc." *Sci Signal* **3**(152): pe49.
- Muller, P. A. and K. H. Vousden (2013). "p53 mutations in cancer." *Nat Cell Biol* **15**(1): 2-8.
- Myant, K. and O. J. Sansom (2011). "Wnt/Myc interactions in intestinal cancer: partners in crime." *Exp Cell Res* **317**(19): 2725-2731.
- Nakagawa, H., G. J. Nuovo, E. E. Zervos, E. W. Martin, Jr., R. Salovaara, L. A. Aaltonen and A. de la Chapelle (2001). "Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development." *Cancer Res* **61**(19): 6991-6995.
- Ni, H., A. B. Dydensborg, F. E. Herring, N. Basora, D. Gagne, P. H. Vachon and J. F. Beaulieu (2005). "Upregulation of a functional form of the beta4 integrin subunit in colorectal cancers correlates with c-Myc expression." *Oncogene* **24**(45): 6820-6829.
- Nie, Z., G. Hu, G. Wei, K. Cui, A. Yamane, W. Resch, R. Wang, D. R. Green, L. Tessarollo, R. Casellas, K. Zhao and D. Levens (2012). "c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells." *Cell* **151**(1): 68-79.
- Nishida, W., M. Nakamura, S. Mori, M. Takahashi, Y. Ohkawa, S. Tadokoro, K. Yoshida, K. Hiwada, K. Hayashi and K. Sobue (2002). "A triad of serum response factor and the GATA and NK

- families governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes." *J Biol Chem* **277**(9): 7308-7317.
- Obata, H., K. Hayashi, W. Nishida, T. Momiyama, A. Uchida, T. Ochi and K. Sobue (1997). "Smooth muscle cell phenotype-dependent transcriptional regulation of the alpha1 integrin gene." *J Biol Chem* **272**(42): 26643-26651.
- Onodera, Y., J. M. Nam and H. Sabe (2013). "Intracellular trafficking of integrins in cancer cells." *Pharmacol Ther* **140**(1): 1-9.
- Oster, S. K., C. S. Ho, E. L. Soucie and L. Z. Penn (2002). "The myc oncogene: Marvelously Complex." *Adv Cancer Res* **84**: 81-154.
- Pande, R., A. Sunga, C. Levea, G. E. Wilding, W. Bshara, M. Reid and M. G. Fakih (2008). "Significance of signet-ring cells in patients with colorectal cancer." *Dis Colon Rectum* **51**(1): 50-55.
- Parsons, J. T., A. R. Horwitz and M. A. Schwartz (2010). "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 633-643.
- Paulsson, M. (1992). "Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**(1-2): 93-127.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Pignatelli, M., M. E. Smith and W. F. Bodmer (1990). "Low expression of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas." *Br J Cancer* **61**(4): 636-638.
- Pomerleau, V., M. Landry, J. Bernier, P. H. Vachon and C. Saucier (2014). "Met receptor-induced Grb2 or Shc signals both promote transformation of intestinal epithelial cells, albeit they are required for distinct oncogenic functions." *BMC Cancer* **14**(1): 1-15.
- Powell, D. W., R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada and A. B. West (1999). "Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease." *Am J Physiol* **277**(1 Pt 1): C1-9.
- Powell, D. W., R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada and A. B. West (1999). "Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts." *Am J Physiol* **277**(2 Pt 1): C183-201.
- Pozzi, A., P. E. Moberg, L. A. Miles, S. Wagner, P. Soloway and H. A. Gardner (2000). "Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(5): 2202-2207.
- Pozzi, A., K. K. Wary, F. G. Giancotti and H. A. Gardner (1998). "Integrin alpha1beta1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo." *J Cell Biol* **142**(2): 587-594.
- Pretlow, T. P., B. J. Barrow, W. S. Ashton, M. A. O'Riordan, T. G. Pretlow, J. A. Jurcisek and T. A. Stellato (1991). "Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa." *Cancer Res* **51**(5): 1564-1567.
- Pujuguet, P., A. Hammann, F. Martin and M. Martin (1994). "Abnormal basement membrane in tumors induced by rat colon cancer cells." *Gastroenterology* **107**(3): 701-711.
- Reinus, J. F. and D. Simon (2014). *Gastrointestinal Anatomy and Physiology : The Essentials*, Wiley-Blackwell.
- Reynolds, G. A., S. K. Basu, T. F. Osborne, D. J. Chin, G. Gil, M. S. Brown, J. L. Goldstein and K. L. Luskey (1984). "HMG CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions." *Cell* **38**(1): 275-285.
- Ricci-Vitiani, L., R. Pallini, M. Biffoni, M. Todaro, G. Invernici, T. Cenci, G. Maira, E. A. Parati, G. Stassi, L. M. Larocca and R. De Maria (2010). "Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells." *Nature* **468**(7325): 824-828.

- Roberts, P. J. and C. J. Der (2007). "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer." *Oncogene* **26**(22): 3291-3310.
- Rochlitz, C. F., R. Herrmann and E. de Kant (1996). "Overexpression and amplification of c-myc during progression of human colorectal cancer." *Oncology* **53**(6): 448-454.
- Sabo, A., T. R. Kress, M. Pelizzola, S. de Pretis, M. M. Gorski, A. Tesi, M. J. Morelli, P. Bora, M. Doni, A. Verrecchia, C. Tonelli, G. Faga, V. Bianchi, A. Ronchi, D. Low, H. Muller, E. Guccione, S. Campaner and B. Amati (2014). "Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis." *Nature* **511**(7510): 488-492.
- Sajithlal, G. B., T. F. McGuire, J. Lu, D. Beer-Stolz and E. V. Prochownik (2010). "Endothelial-like cells derived directly from human tumor xenografts." *Int J Cancer* **127**(10): 2268-2278.
- Salari, K., M. E. Spulak, J. Cuff, A. D. Forster, C. P. Giacomini, S. Huang, M. E. Ko, A. Y. Lin, M. van de Rijn and J. R. Pollack (2012). "CDX2 is an amplified lineage-survival oncogene in colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(46): E3196-3205.
- Sandelin, A., P. Carninci, B. Lenhard, J. Ponjavic, Y. Hayashizaki and D. A. Hume (2007). "Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies." *Nat Rev Genet* **8**(6): 424-436.
- Seltana, A., N. Basora and J. F. Beaulieu (2010). "Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system." *Wound Repair Regen* **18**(1): 114-122.
- Seltana A, L. M., Beaulieu JF (2012). Alteration of the Crypt Epithelial-Stromal Interface by Proinflammatory Cytokines in Crohn's Disease. *Crohn's Disease*. S. Karoui. Janeza, Croatia, INTECH: 1-16.
- Senger, D. R., K. P. Claffey, J. E. Benes, C. A. Perruzzi, A. P. Sergiou and M. Detmar (1997). "Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13612-13617.
- Senger, D. R., C. A. Perruzzi, M. Streit, V. E. Kotliansky, A. R. de Fougères and M. Detmar (2002). "The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis." *Am J Pathol* **160**(1): 195-204.
- Shattil, S. J., C. Kim and M. H. Ginsberg (2010). "The final steps of integrin activation: the end game." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(4): 288-300.
- Shaw, L. M. (2001). "Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the alpha6beta4 integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion." *Mol Cell Biol* **21**(15): 5082-5093.
- Shin, S., L. Wolgamott and S. O. Yoon (2012). "Integrin trafficking and tumor progression." *Int J Cell Biol* **2012**: 516789.
- Sica, A., P. Larghi, A. Mancino, L. Rubino, C. Porta, M. G. Totaro, M. Rimoldi, S. K. Biswas, P. Allavena and A. Mantovani (2008). "Macrophage polarization in tumour progression." *Semin Cancer Biol* **18**(5): 349-355.
- Sikora, K., S. Chan, G. Evan, H. Gabra, N. Markham, J. Stewart and J. Watson (1987). "c-myc oncogene expression in colorectal cancer." *Cancer* **59**(7): 1289-1295.
- Smale, S. T. and J. T. Kadonaga (2003). "The RNA polymerase II core promoter." *Annu Rev Biochem* **72**: 449-479.
- Song, J., J. Zhang, J. Wang, X. Guo and W. Dong (2015). "beta1 integrin mediates colorectal cancer cell proliferation and migration through regulation of the Hedgehog pathway." *Tumour Biol* **36**(3): 2013-2021.
- Soung, Y. H., J. L. Clifford and J. Chung (2010). "Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression." *BMB Rep* **43**(5): 311-318.

- Stallmach, A., B. von Lampe, H. Matthes, G. Bornhofs and E. O. Riecken (1992). "Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation." *Gut* **33**(3): 342-346.
- Sterry, W., V. Mielke, U. Konter, I. Kellner and W. H. Boehncke (1992). "Role of beta 1-integrins in epidermotropism of malignant T cells." *Am J Pathol* **141**(4): 855-860.
- Su, X., C. Lv, F. Qiao, X. Qiu, W. Huang, Q. Wu, Z. Zhao and H. Fan (2010). "Expression pattern and clinical significance of DNA methyltransferase 3B variants in gastric carcinoma." *Oncol Rep* **23**(3): 819-826.
- Suzuki, H., S. Igarashi, M. Nojima, R. Maruyama, E. Yamamoto, M. Kai, H. Akashi, Y. Watanabe, H. Yamamoto, Y. Sasaki, F. Itoh, K. Imai, T. Sugai, L. Shen, J. P. Issa, Y. Shinomura, T. Tokino and M. Toyota (2010). "IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype." *Carcinogenesis* **31**(3): 342-349.
- Takada, Y., X. Ye and S. Simon (2007). "The integrins." *Genome Biol* **8**(5): 215.
- Takahashi, Y., S. Kawate, M. Watanabe, J. Fukushima, S. Mori and T. Fukusato (2007). "Amplification of c-myc and cyclin D1 genes in primary and metastatic carcinomas of the liver." *Pathol Int* **57**(7): 437-442.
- Tan, Y., J. Fu, X. Li, J. Yang, M. Jiang, K. Ding, J. Xu, J. Li and Y. Yuan (2015). "A minor (<50%) signet-ring cell component associated with poor prognosis in colorectal cancer patients: a 26-year retrospective study in China." *PLoS One* **10**(3): e0121944.
- Tanaka, M., H. Saito, T. Kusumi, S. Fukuda, T. Shimoyama, Y. Sasaki, K. Suto, A. Munakata and H. Kudo (2001). "Spatial distribution and histogenesis of colorectal Paneth cell metaplasia in idiopathic inflammatory bowel disease." *J Gastroenterol Hepatol* **16**(12): 1353-1359.
- Tanaka, N. and M. Fukuzawa (2008). "MYCN downregulates integrin alpha1 to promote invasion of human neuroblastoma cells." *Int J Oncol* **33**(4): 815-821.
- Teller, I. C. and J. F. Beaulieu (2001). "Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease." *Expert Rev Mol Med* **3**(24): 1-18.
- Teye, K., K. Okamoto, Y. Tanaka, T. Umata, M. Ohnuma, M. Moroi, H. Kimura and M. Tsuneoka (2008). "Expression of the TAF4b gene is induced by MYC through a non-canonical, but not canonical, E-box which contributes to its specific response to MYC." *Int J Oncol* **33**(6): 1271-1280.
- Timpl, R. (1996). "Macromolecular organization of basement membranes." *Curr Opin Cell Biol* **8**(5): 618-624.
- Toon, C. W., A. Chou, A. Clarkson, K. DeSilva, M. Houang, J. C. Chan, L. L. Sioson, L. Jankova and A. J. Gill (2014). "Immunohistochemistry for myc predicts survival in colorectal cancer." *PLoS One* **9**(2): e87456.
- Uhlen, M., L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szigartyo, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen and F. Ponten (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." *Science* **347**(6220): 1260419.
- Vachon, P. H. (2011). "Integrin signaling, cell survival, and anoikis: distinctions, differences, and differentiation." *J Signal Transduct* **2011**.
- Vachon, P. H. and J. F. Beaulieu (1992). "Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line." *Gastroenterology* **103**(2): 414-423.

- van Beest, M., D. Dooijes, M. van De Wetering, S. Kjaerulff, A. Bonvin, O. Nielsen and H. Clevers (2000). "Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs." *J Biol Chem* **275**(35): 27266-27273.
- van de Wetering, M., R. Cavallo, D. Dooijes, M. van Beest, J. van Es, J. Loureiro, A. Ypma, D. Hursh, T. Jones, A. Bejsovec, M. Peifer, M. Mortin and H. Clevers (1997). "Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF." *Cell* **88**(6): 789-799.
- Van Slambrouck, S., C. Grijelmo, O. De Wever, E. Bruyneel, S. Emami, C. Gespach and W. F. Steelant (2007). "Activation of the FAK-src molecular scaffolds and p130Cas-JNK signaling cascades by α 1-integrins during colon cancer cell invasion." *Int J Oncol* **31**(6): 1501-1508.
- Varma, R. R., S. M. Hector, K. Clark, W. R. Greco, L. Hawthorn and L. Pendyala (2005). "Gene expression profiling of a clonal isolate of oxaliplatin-resistant ovarian carcinoma cell line A2780/C10." *Oncol Rep* **14**(4): 925-932.
- Veganzones-de-Castro, S., S. Rafael-Fernandez, M. Vidaurreta-Lazaro, V. de-la-Orden, B. Mediero-Valeros, C. Fernandez and M. L. Maestro-de las Casas (2012). "p16 gene methylation in colorectal cancer patients with long-term follow-up." *Rev Esp Enferm Dig* **104**(3): 111-117.
- Vicente-Manzanares, M., C. K. Choi and A. R. Horwitz (2009). "Integrins in cell migration--the actin connection." *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 199-206.
- Vicente-Manzanares, M., D. J. Webb and A. R. Horwitz (2005). "Cell migration at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 21): 4917-4919.
- Wang, Q., C. Lasset, F. Desseigne, J. C. Saurin, C. Maugard, C. Navarro, E. Ruano, L. Descos, V. Trillet-Lenoir, J. F. Bosset and A. Puisieux (1999). "Prevalence of germline mutations of hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, and hMSH6 genes in 75 French kindreds with nonpolyposis colorectal cancer." *Hum Genet* **105**(1-2): 79-85.
- Wary, K. K., A. Mariotti, C. Zurzolo and F. G. Giancotti (1998). "A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth." *Cell* **94**(5): 625-634.
- Wei, J., L. M. Shaw and A. M. Mercurio (1998). "Regulation of mitogen-activated protein kinase activation by the cytoplasmic domain of the α 6 integrin subunit." *J Biol Chem* **273**(10): 5903-5907.
- Weisenberger, D. J., K. D. Siegmund, M. Campan, J. Young, T. I. Long, M. A. Faasse, G. H. Kang, M. Widschwendter, D. Weener, D. Buchanan, H. Koh, L. Simms, M. Barker, B. Leggett, J. Levine, M. Kim, A. J. French, S. N. Thibodeau, J. Jass, R. Haile and P. W. Laird (2006). "CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer." *Nature genetics* **38**(7): 787-793.
- Xu, W., Y. Cheng and X. F. Shen (2012). "[A study on the mutation of P53 and K-ras gene in colorectal adenomas and colorectal carcinomas]." *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **43**(6): 821-826.
- Yang, C., M. Zeisberg, J. C. Lively, P. Nyberg, N. Afdhal and R. Kalluri (2003). "Integrin α 1 β 1 and α 2 β 1 are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment." *Cancer Res* **63**(23): 8312-8317.
- Yang, H., T. W. Li, K. S. Ko, M. Xia and S. C. Lu (2009). "Switch from Mnt-Max to Myc-Max induces p53 and cyclin D1 expression and apoptosis during cholestasis in mouse and human hepatocytes." *Hepatology* **49**(3): 860-870.
- Yang, Y., J. J. Yang, H. Tao and W. S. Jin (2014). "New perspectives on beta-catenin control of cell fate and proliferation in colon cancer." *Food Chem Toxicol* **74**: 14-19.

- Yin, X., C. Giap, J. S. Lazo and E. V. Prochownik (2003). "Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function." *Oncogene* **22**(40): 6151-6159.
- Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi and B. Geiger (2004). "Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt3): 416-420.